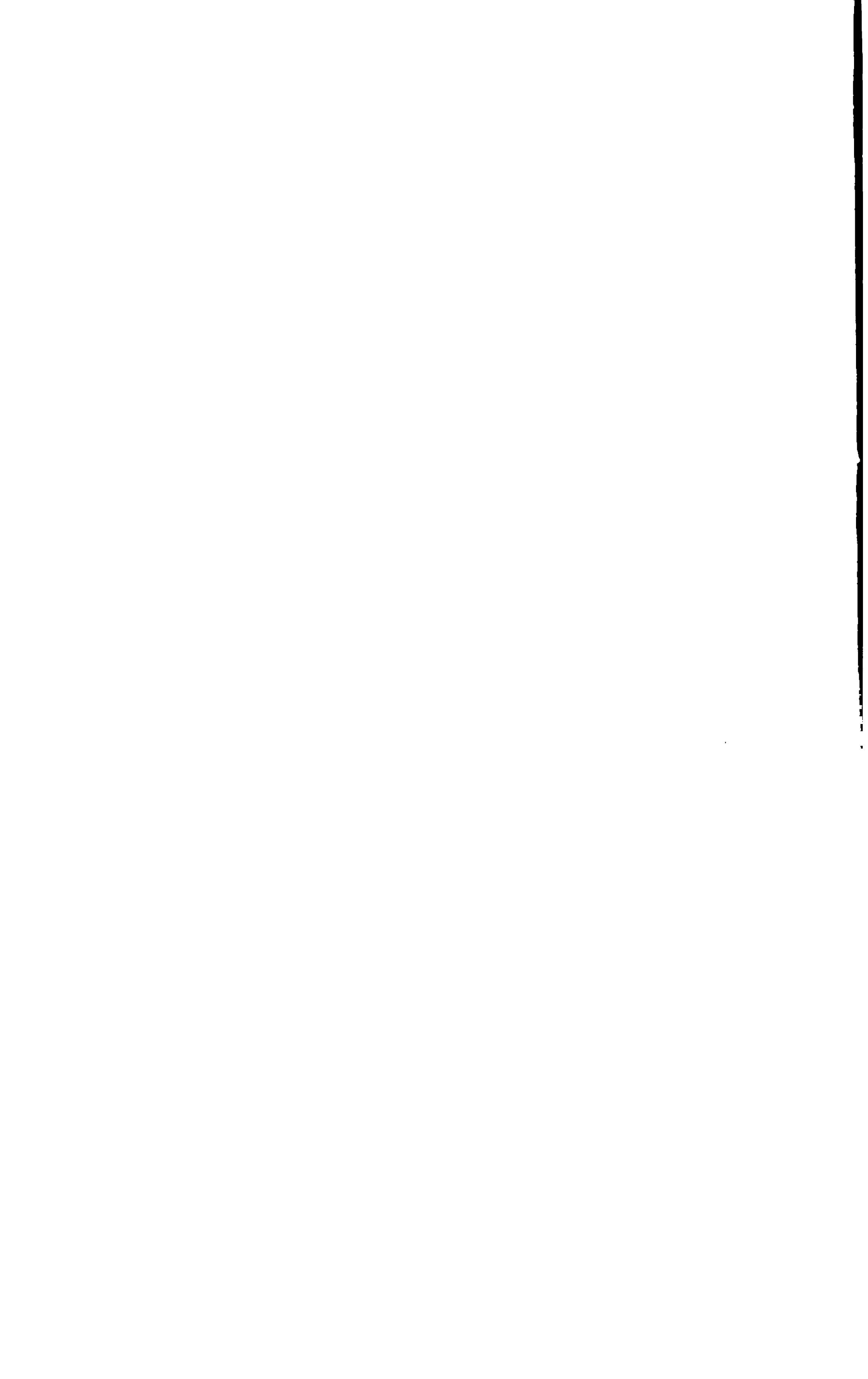




Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertvierundfünfzigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1924



Inhalt.

Über die Ermittlung des Tyrosingehalts von Proteinen. III.

Von

Otto Fürth und Anton Fischer.

(Aus der chemischen Abteilung des Wiener physiologischen Universitätsinstituts.)

(Eingegangen am 12. Oktober 1924.)

I. Einleitung.

Auf Grund früherer Untersuchungen[1]) war der eine von uns zu dem Schlußergebnis gelangt, daß keine der für die Ermittlung des Tyrosingehaltes von Proteinen bisher vorgeschlagenen Methoden, weder die *Diazoreaktion*, noch die *Bromaddition*, weder die *Farbenreaktion mit Phosphormolybdänsäure*, noch die *Millonsche Reaktion* und sicherlich auch nicht die *gravimetrische Bestimmung* uns ein wirklich zuverlässiges Mittel in die Hand gibt, um den Tyrosingehalt eines Proteins in einwandfreier Weise ermitteln zu können.

Unter den diskutierten Methoden schien immerhin die kolorimetrische Auswertung der *Millonschen Reaktion* insofern besondere Beachtung zu verdienen, als derselben, als einer Reaktion der Phenolgruppe, doch eine gewisse Spezifizität zukommt. Der Versuch einer kolorimetrischen Schätzung des Tyrosingehaltes auf Grund der *Millonschen* Reaktion ist zuerst von *M. Weiss*[2]) angestellt worden. Es mußte als ein Fortschritt bezeichnet werden, daß *Pierre Thomas*[3]) die Niederschlagsbildungen, welche Millonproben beim Erwärmen stets geben, dadurch vermeidet, daß er die Reaktion, *statt schnell durch Erwärmen, im Laufe einiger Stunden bei Zimmertemperatur sich abspielen läßt.*

Der Vorgang von *Thomas* ist im wesentlichen der, daß 2 g des trockenen Eiweißkörpers 10 bis 12 Stunden lang unter Rückfluß mit 25proz. H_2SO_4 hydrolysiert werden. Die Schwefelsäure wird durch Baryt beseitigt. Dann erfolgt Fällung mit einer 20proz., durch Erwärmen mit Harnstoff von

[1]) *O. Fürth* und *W. Fleischmann*, diese Zeitschr. **127**, 137, 1922; *O. Fürth*, ebendaselbst **146**, 259, 1924.

[2]) *M. Weiss*, ebendaselbst **97**, 170, 1919; vgl. auch *O. Fürth* und *W. Fleischmann*, l. c., S. 146.

[3]) *P. Thomas*, Bull. de la Soc. de Chem. Biol. **3**, Nr. 5, Juni 1921; Ann. Inst. Pasteur. **36**, 253, 1922.

HNO_2 befreiten *Mercurinitrat*lösung unter Vermeidung eines Überschusses. Das Filtrat wurde eventuell durch Schütteln mit Tierkohle entfärbt. Schließlich ward die Millonfärbung produziert, indem 10 ccm des Filtrats mit 2 ccm von *Millon*schem Reagens versetzt und 2 Stunden bei Zimmertemperatur belassen werden. Zum Farbenvergleich diente eine frisch bereitete 0,1 proz. Tyrosinlösung in 2 proz. HNO_3 (oder aber ein aus Xylidinponceau, Naphtholgelb S und Indigocarmin zusammengesetztes Farbengemisch). Der so gewonnene „Indice phénolique" gibt im allgemeinen sehr hohe Werte. Casein: Indice phénolique 8,5, Bromadditionsverfahren nach *Fürth-Fleischmann* 5,3 Proz; Fibrin: Indice phénolique 7,6 Proz., Bromadditionsverfahren nach *Fürth-Fleischmann* 4,7 Proz. und wird als ein Charakterisierungsmittel der Proteine, das aber nicht ausschließlich Tyrosin bedeutet, aufgefaßt[1]).

Einen anderen neuen Weg zur Tyrosinbestimmung hat *Dakin*[2]) versucht, indem er das Schwefelsäurehydrolysat von Zein mit *Butylalkohol* extrahierte, wobei ein Teil des Tyrosins auskristallisiert. Der nicht kristallisierende Anteil des Tyrosins wurde mit Kaliumcyanat in eine Uraminosäure übergeführt und ließ sich dann mit Äther extrahieren. In Zein wurden so 5,2 Proz. Tyrosin gefunden.

In jüngster Zeit haben *Plimmer*[3]) und seine Mitarbeiter in Eiweißhydrolysaten nach Beseitigung der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen das Tyrosin sowohl nach *Folin* und *Denis* als nach dem *Bromadditions*verfahren bestimmt. Zu hydrolysierter Gelatine zugesetztes Tyrosin konnte so richtig wiedergefunden werden. Nach *Folin* wurden in Casein gefunden 5,3 bis 6,4 Proz., in Wolle 5,6 bis 6,1 Proz., in Eieralbumin 5,0 bis 5,7 Proz. Tyrosin. Für das mit dem Bromadditionsverfahren vielfach gefundene Zuviel an Tyrosin glaubt *Plimmer* vor allem *Cystinspaltungsprodukte*, die der Phosphorwolframsäurefällung entgangen sind, verantwortlich machen zu dürfen.

Wir haben uns nun zunächst die Frage vorgelegt, ob man nicht doch durch eine sinngemäße Abänderung des *Thomas*schen Verfahrens der sich hier ergebenden Schwierigkeiten Herr werden könne.

II. Caseinversuche mit Enteiweißung durch Mercurinitrat oder -sulfat.

1. Versuch nach Thomas.

2 g Casein Hammarsten wurden 12 Stunden lang unter Rückflußkühlung mit 3½ ccm konzentrierter H_2SO_4 und 20½ ccm Wasser *hydrolysiert.* Die schwärzliche Lösung wurde filtriert, nachgewaschen. Dazu 25 g feingepulverten Ätzbaryts, gelöst in 35 ccm siedenden Wassers. Die nunmehr alkalische Lösung wurde mit einigen Tropfen konzentrierter HNO_3 neutralisiert, im Meßkolben auf 100 ccm aufgefüllt und filtriert.

---

[1]) *Thomas* weist darauf hin, daß auch *Oxytryptophan* nach *Abderhalden* gleichfalls die *Millon*sche Reaktion gibt. — In diesem Zusammenhange sei daran erinnert, daß *N. Troensegaard* (Zeitschr. f. physiol. Chem. **130**, 84, 1923) auch das Vorkommen sehr unbeständiger *Oxypyrrole* in Proteinen behauptet.

[2]) *H. D. Dakin*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **130**, 159, 1923.

[3]) *R. H. A. Plimmer* mit *H. Philipps* und *T. Schimamura*, Biochem. Journ. **18**, 313, 322, 1924.

a) 30 ccm des so erhaltenen Filtrats wurden mit 7 ccm einer 20proz. (durch Kochen mit wenig Harnstoff von salpetriger Säure befreiten) *Mercurinitratlösung* versetzt und nach einigem Stehen filtriert. 10 ccm des [durch $Hg(NO_3)_2$ nicht weiter fällbaren] Filtrats wurden nunmehr mit 2 ccm *Millonscher Reagenzlösung*[1]) versetzt. Es fiel sofort ein spärlicher Niederschlag aus; im Verlauf von 2½ Stunden trat schöne Rotfärbung ein, ohne weitere Zunahme der Trübung. Nunmehr wurde nach Filtration der *kolorimetrische Vergleich* mit einer *Tyrosinstandardlösung* vorgenommen; 10 ccm einer frisch bereiteten 0,1proz. Tyrosinlösung in 2proz. HNO_3 wurden mit 2 ccm der Millonlösung versetzt; innerhalb 1½ Stunden schöne Rotfärbung, keine Trübung. Dem kolorimetrischen Vergleich (mit Hilfe eines Dubosq-Apparats) zufolge würde das Casein **6,8 Proz. Tyrosin** enthalten.

b) Nachdem wir uns überzeugt hatten, daß die Gegenwart von *Hopkinsschem Reagens* (10proz. Mercurisulfat in verdünnter 5proz. Schwefelsäure gelöst) den Eintritt der Millonreaktion nicht in auffälliger Weise stört, wurden 10 ccm obigen Barytfiltrats statt mit Mercurinitrat mit 10 ccm *Hopkins*scher Lösung ausgefällt. Vom Filtrat wurden 10 ccm mit 2 ccm Millon versetzt. Standardlösung: 5 ccm 0,1proz. Tyrosin + 5 ccm Hopkinsreagens + 2 ccm Millon. Kolorimetrie: **5,0 Proz. Tyrosin.**

2. Versuch. Hopkinsfällung.

Hydrolyse wie in Versuch 1. Die Bariumsulfatfällung scharf abgenutscht. 20 ccm des Filtrats mit 40 ccm *Hopkinsreagens* gefällt, nach Stehen über Nacht durch ein trockenes Filter filtriert. 10 ccm des Filtrats (entsprechend 0,078 g Casein) mit 2 ccm Millon versetzt. Nach Ablauf von 2 Stunden Kolorimetrie wie oben: **6,0 Proz. Tyrosin.**

3. Versuch. Hopkinsfällung.

a) Hydrolyse wie oben. 20 ccm des Filtrats (entsprechend 0,40 g Casein) mit 20 ccm Hopkinsreagens versetzt, über Nacht stehengelassen, filtriert. Vom klaren Filtrat 10 ccm sogleich mit 2 ccm Millon versetzt: fast momentane, jedoch schnell abblassende Rötung. Die bereits vorher angesetzte *Standard*lösung wurde in der Weise bereitet, daß 5 ccm einer 0,1proz. Tyrosinlösung in 5proz. H_2SO_4 mit 5 ccm Hopkinslösung und 2 ccm Millon versetzt wurden. Die Rotfärbung hatte nach etwa ¾ Stunden ihr Maximum erreicht. Kolorimetrie: **5,0 Proz. Tyrosin.**

b) Analoger Versuch, jedoch mit der Abweichung, daß auf 20 ccm des Filtrats ein größerer Überschuß von Hopkinsreagens zugesetzt wurde. Dementsprechend wurde auch die Zusammensetzung der Standardlösung abgeändert. [4 ccm 0,1proz. Tyrosin (in 5proz. H_2SO_4 gelöst) + 6 ccm Hopkinsreagens.] Die Kolorimetrie ergab sofort **7,6, 6,9 Proz.,** nach 10 Minuten nurmehr **5,4 Proz. Tyrosin.**

Es stellte sich nun aber weiter beim Vergleich von Proben mit und ohne Zusatz von *Hopkinsreagens* heraus, daß die letzteren ihr Färbungsmaximum erst nach etwa 1½ Stunden erreichen und etwa

[1]) Das *Millonsche Reagens* wurde durch Auflösen von einem Gewichtsteile metallischen Quecksilbers in zwei Gewichtsteilen Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,42 und nachträgliches Verdünnen mit dem doppelten Volumen Wassers gewonnen. Vgl. *Plugge*, Arch. f. Pharm. 228, 9, 189.

1 Stunde lang bewahren. Die quecksilbersulfathaltigen Proben dagegen erreichten ihr Maximum bereits nach 3/4 Stunden, und dieses lag nun etwa 15 Proz. höher als bei den Kontrollproben; es erwies sich aber als höchst unbeständig, insofern die Färbungsintensität eine rapide Abnahme erkennen ließ. Man ist also berechtigt, einen *katalytischen Einfluß des Mercurisulfatreagens* auf den Ablauf der *Millon*schen Farbenreaktion anzunehmen, und es liegt auf der Hand, daß eine derartige katalytische Beeinflussung einen Moment unerwünschter Unsicherheit in sich birgt.

4. Versuch. Hopkinsfällung; nachträgliche Beseitigung von Hg mit H_2S.

Der nächstliegende Versuch war nunmehr der, ob es nicht möglich sei, dieses Moment von Unsicherheit dadurch auszuschalten, daß man vor Einleitung der Farbenreaktion den störenden Quecksilberüberschuß etwa mit Hilfe von Schwefelwasserstoff beseitigt. Vor Filtration des HgS-Niederschlages wurde aufgekocht und der Filterinhalt noch einmal sorgfältig mit 5proz. H_2SO_4 ausgekocht. Die Kolorimetrie wurde gegen 0,1 proz. Tyrosin in 5proz. H_2SO_4 vorgenommen. In zwei Versuchen resultierte aber ein viel zu niedriger Tyrosingehalt von nur etwa 3 Proz. Es hatte sich also bei den Prozeduren ein erheblicher Tyrosinverlust nicht vermeiden lassen. Dagegen zeigte in der schließlich resultierenden Tyrosinlösung eine *Serie von Kolorimetrieversuchen*, wobei einerseits die Verdünnung dieser Lösung, andererseits aber die Verdünnung der Standardlösung variiert wurde, eine erfreuliche Konstanz der Ablesungen.

Tyrosinstandard	Errechneter Tyrosingehalt bei einem *Verdünnungsgrade* von			
Proz.	10/10 Proz.	7/10 Proz.	5/10 Proz.	3/10 Proz.
0,10	3,1	3,1	—	—
0,07	3,3	3,0	3,2	—
0,05	3,5	3,5	3,4	3,3
0,03	3,1	3,1	3,2	2,9

Wir waren durch die vorstehenden Versuche also immerhin so weit orientiert, um zu ersehen, daß eine Millonkolorimetrie als solche keineswegs aussichtslos erschien, und wir wußten auch einigermaßen, worauf es ankommt. Die erste Vorbedingung ist die *völlige und restlose Beseitigung aller durch das Millonsche Reagens direkt aus den Hydrolysaten fällbaren Eiweißspaltungsprodukte* (und eine solche erscheint durch den von *Thomas* angegebenen Vorgang nicht ausreichend gewährleistet). Macht doch die geringste Trübung den Versuch jeder Kolorimetrie völlig illusorisch. Eine Fällung durch *Mercurinitrat* und *Mercurisulfat* erscheint aber aus dem Grunde untunlich, weil diese Reagenzien ihrerseits auf den Ablauf der Millonreaktion in undefinierbarer Weise *katalysierend* wirken. Wir mußten also nach einem anderen Fällungsmodus Umschau halten.

III. Methodische Versuche mit Tyrosinlösungen.

Als nächste Forderung jedoch, bevor wir uns an das eigentliche Problem heranwagen konnten, ergab sich die Aufgabe, die *Grundlagen der Millonkolorimetrie* durch Versuche an reinen Tyrosinlösungen einer Überprüfung zu unterziehen.

5. Versuch. Serienversuch mit Tyrosin.

0,1 proz. Tyrosinlösung in 5 proz. H_2SO_4;

	α	β	γ	δ	ε	
davon ccm	8	6	5	3	2	
$+ H_2O$	2	4	5	7	8	
Die Kolorimetrie ergab in	α	β	γ	δ	ε	
anstatt	0,080	0,060	0,050	0,030	0,020	Proz. Tyrosin
	0,073	0,051	0,043	0,024	0,018	„ „
Wurde dagegen, statt Wasser, *Hopkinsreagens* zur Verdünnung der Tyrosinlösung benutzt, so erhielt man allenthalben viel zu hohe Werte	0,081	—	0,063	0,040	0,032	„ „

Ein weiterer analoger Versuch ergab:
statt 0,050 Proz. Tyrosin bei Verdünnung mit H_2O 0,050 Proz. dagegen mit Hopkinsreagens 0,072 Proz.;
statt 0,033 Proz. Tyrosin bei Verdünnung mit H_2O 0,037 Proz., dagegen mit Hopkinsreagens 0,041 Proz.

6. Versuch. Serienversuch mit reinem Tyrosin.

0,1 proz. Tyrosinlösung in 5 proz. H_2SO_4

davon ccm	10	9	8	7	6	5	4	3	2
+ 5 proz. H_2SO_4	—	1	2	3	4	5	6	7	8

Zusatz von je 2 ccm Millon.

Die Kolorimetrie ergab

anstatt	0,90	0,80	0,70	0,60	0,50	0,40	0,30	0,20	Proz. Tyrosin
tatsächlich	0,87	0,73	0,65	0,60	0,50	0,39	0,28	0,20	„ „

Demnach eine Übereinstimmung, die nichts zu wünschen übrig läßt.

7. Versuch.

Einwirkung der Säurehydrolyse und des Zusatzes von Hopkinsreagens.

Um festzustellen, ob etwa bereits die protrahierte Säurehydrolyse als solche für das Tyrosin deletär sei (Huminbildung ?), ob andererseits bei Hydrolysaten beobachtete störende Wirkung des Zusatzes von *Hopkins*schem Reagens auch bei reinen Tyrosinlösungen sich geltend mache, wurde 0,1 g Tyrosin unter Zusatz von 3½ ccm konzentrierter H_2SO_4 und 21½ ccm H_2O 12 Stunden unter Rückfluß gekocht, sodann auf 100 ccm aufgefüllt. Davon wurden 20 ccm nach Zusatz von 20 ccm *Hopkinsreagens* über Nacht stehengelassen. Von dieser Mischung wurden 10 ccm entnommen, mit 2 ccm Millon versetzt. *Standardlösung*: 0,1 proz. Tyrosin in 5 proz. H_2SO_4 zu gleichen Teilen mit Hopkinslösung verdünnt, davon 10 ccm + 2 ccm Millon. Das kolorimetrische Maximum wurde erst nach etwa ¾ Stunden erreicht und die in den Eiweißhydrolysaten beobachtete darauffolgende rapide Abnahme der Färbung blieb hier ganz aus.

Statt 0,050 Proz. Tyrosin wurde gefunden: 0,052, 0,056, 0,050 Proz., also eine befriedigende Übereinstimmung. Offenbar ist also weder die *Schwefelsäure* als solche, noch das *Hopkinsreagens* selbst für die Störungen der Kolorimetrie allein verantwortlich; dieselben hängen vielmehr mit der *Gegenwart von Bestandteilen der Eiweißhydrolysate* zusammen.

8. Versuch. Verdünnung mit verdünnter Schwefelsäure.

Eine weitere Verdünnungsweise wurde derart angestellt, daß die Verdünnung statt mit Wasser, mit 5proz. Schwefelsäure ausgeführt wurde. Es resultierte

statt	0,100	0,090	0,080	0,070	0,060	0,050	0,040	0,030 Proz. Tyrosin
		0,080	0,066	0,055	0,050	0,044	0,035	0,025 ,, ,,

also immerhin eine weniger befriedigende Übereinstimmung wie in Versuch 2.

9. Versuch. Verdünnung mit verdünnter Schwefelsäure.

Probe								
Probe	a)	5 ccm	0,1 proz. Tyrosin	+ 5 ccm	H_2O + 0 ccm	5 proz.	H_2SO_4
„	b)	5 „	0,1 „ „	+ 3 „	H_2O + 2 „	5 „	H_2SO_4
„	c)	5 „	0,1 „ „	+ 0 „	H_2O + 5 „	5 „	H_2SO_4
„	d)	5 „	0,1 „ „	+ 0 „	H_2O + 5 „	10 „	H_2SO_4

gefunden statt 0,050 Proz. Tyrosin 0,050 Proz.
„ 0,040 „
„ 0,039 „
„ 0,031 „

Der störende Einfluß eines großen Schwefelsäureüberschusses kann somit nicht bezweifelt werden.

10. Versuch. Hydrolyse und Gelatinezusatz.

2 g reiner Gelatine wurden mit 0,1 g Tyrosin vermengt, derart, daß das Eiweißgemenge 5,0 Proz. Tyrosin enthielt (die Gelatine als tyrosinfrei gerechnet!). Das Gemenge wurde mit 3½ ccm konzentrierter H_2SO_4 + 21½ ccm H_2O 12 Stunden unter Rückfluß hydrolysiert, sodann auf 100 ccm aufgefüllt. Zum Zwecke der Enteiweißung wurden 20 ccm des Hydrolysats mit 20 ccm Hopkinsreagens ausgefällt, nach Stehen über Nacht filtriert. Kolorimetrie gegen Standard: 0,1 proz. Tyrosin in 5proz. H_2SO_4, zu gleichen Teilen mit Hopkinsreagens verdünnt, also 0,05 Proz. Tyrosin. Das Hydrolysat wurde in drei Verdünnungsgraden kolorimetriert:

unverdünnt	statt	5 Proz.	Tyrosin im Eiweißgemenge	gefunden	4,7 Proz.
½ verdünnt	,,	5 ,,	,, ,, ,,	,,	5,8 ,,
1/5 ,,	,,	5 ,,	,, ,, ,,	,,	5,0 ,,
				Mittel	5,3 Proz.

also *ausreichende Übereinstimmung.*

11. Versuch. Hydrolyse mit Gelatinezusatz.

Analoger Versuch. Diesmal ergab sich ein unerwünschtes Plus; statt 5,0 Proz. Tyrosin im Eiweißgemenge wurden wiedergefunden:

unverdünnt	6,2 Proz.
bei Verdünnung des Hydrolysats 8 : 2 H_2O . . .	7,1 ,,
,, ,, ,, ,, 5 : 5 H_2O . . .	7,1 ,,
,, ,, ,, ,, 3 : 7 H_2O . . .	7,6 ,,
,, ,, ,, ,, 2 : 8 H_2O . . .	7,1 ,,

Also im Mittel etwa 2 Proz. zuviel. Dieser Fehler reduziert sich allerdings durch den Umstand, daß, wie später festgestellt wurde, die Gelatine nicht tyrosinfrei war, vielmehr etwa 1,2 Proz. Tyrosin enthielt.

12. Versuch. Zusatz von Hopkinsreagens. Beseitigung von Hg durch H_2S.

0,1 proz. Tyrosinlösung, $\overline{aa}$ mit Hopkinsreagens verdünnt, also 0,05 Proz. Tyrosin. Beseitigung des Hg durch H_2S. Aliquoter Teil verdünnt.

Kolorimetrie bei Verdünnung	$^{10}/_{10}$	$^{5}/_{10}$	$^{3}/_{10}$	
	0,031 Proz.	0,25 Proz.	0,29 Proz.	Im Mittel: 0,30 Proz. statt 0,050 Proz.
	0,033 „	0,29 „	0,25 „	
	0,030 „	0,30 „		

Das Tyrosinmanko wurde wiedergefunden, als der Quecksilbersulfidniederschlag mit 5proz. H_2SO_4 ausgekocht wurde. Es fanden sich so noch 0,016, 0,015, 0,016 Proz., im Mittel 0,016 Proz., derart, daß schließlich 0,030 + 0,016 = **0,046 statt 0,050 Proz.** resultierten.

Überblicken wir nunmehr die vorliegenden Versuche, so gelangen wir zu dem Ergebnis, daß die *Millon*sche Farbenreaktion, wenn man dieselbe unter Einhaltung ganz bestimmter Versuchsbedingungen bei Zimmertemperatur, jedoch unter Vermeidung des Erhitzens, sich abspielen läßt, tatsächlich die Möglichkeit bietet, die Konzentration reiner Tyrosinlösungen mit für physiologische Zwecke ausreichender Genauigkeit ermitteln zu können. Handelt es sich jedoch um Tyrosinbestimmung in Eiweißhydrolysaten, so erscheint als erste conditio sine qua non die restlose Beseitigung aller jener Hydrolysatbestandteile, welche mit dem Millonreagens direkt oder bei längerem Stehen Niederschläge oder Trübungen geben. Wird diese Bedingung durch Mercurinitrat oder -sulfat erfüllt, so kann sich eine störende Wirkung der in der Lösung vorhandenen *Quecksilberionen* bemerkbar machen; auch ein *Überschuß von Mineralsäure* erscheint für den Ablauf der Reaktion nicht ganz gleichgültig. Es ergab sich also die Notwendigkeit, die *Enteiweißung* der tyrosinhaltigen Eiweißhydrolysate derart zu bewerkstelligen, daß diese Übelstände umgangen, vor allem aber auch die gefährliche Mitfällung von Tyrosin durch die Niederschläge vermieden werden könne.

IV. Caseinversuche. Phosphorwolframsäure-Chininverfahren.

Indem wir eine Anzahl von Fehlversuchen übergehen, gelangen wir zu jenem Vorgang, der uns schließlich zum Ziele geführt hat. Derselbe beruht darauf, daß die sauren Hydrolysate mit Hilfe eines Überschusses von *Phosphorwolframsäure* von allen durch dieses Reagens fällbaren Eiweißspaltungsprodukten befreit werden; sodann wird der Überschuß von Phosphorwolframsäure durch eine Lösung von *Chininsulfat*, der Chininüberschuß aus dem Filtrat aber schließlich durch *Ammoniak oder Natronlauge* beseitigt. Man erhält so eine klare, wasserhelle Lösung, in der der Tyrosingehalt ebenso wie in einer reinen

Tyrosinlösung anstandslos auf dem Wege der Millonkolorimetrie ermittelt werden kann.

13. Versuch.

5 g Casein nach *Hammarsten* wurden mit 3½ ccm konzentrierter H_2SO_4 und 21½ ccm Wasser unter Rückflußkühlung 12 Stunden lang hydrolysiert; sodann wurde im Meßkolben auf 100 ccm aufgefüllt. 20 ccm dieses Hydrolysats (entsprechend 1 g Casein) wurden mit 20 ccm einer 20proz. *Phosphorwolframsäurelösung* gefällt. Der voluminöse Niederschlag wurde nach eintägigem Stehen auf einem Buchnerfilter scharf abgenutscht, sodann mit wenig *5proz. Schwefelsäure* gut verrieben und wieder scharf abgenutscht (das zweite Filtrat gab nunmehr eine minimale Millonreaktion). Die vereinigten Filtrate wurden weiter mit einigen Kubikzentimetern einer *5proz. Chininsulfatlösung in 5proz. Schwefelsäure* gefällt, abgemessen und durch ein trockenes Filter filtriert. 10 ccm des Filtrats wurden mit 5 ccm einer 10proz. Ammoniaklösung versetzt, wobei der Chininüberschuß gefällt wurde. Es wurde wieder durch ein trockenes Filter filtriert. Es resultierten 13 ccm einer Lösung, welche mit 12 ccm 10proz. Schwefelsäure versetzt wurde. (Der Umrechnung zufolge entsprach die zuletzt erhaltene Flüssigkeit einem 0,76proz. Caseinhydrolysat.)

Die Millonkolorimetrie (Standard: 10 ccm einer 0,1proz. Tyrosinlösung in 5proz. H_2SO_4, dazu 2 ccm Millonreagens) ergab für das Casein einen Tyrosingehalt von **6,8 Proz.**

14. Versuch.

Caseinhydrolyse wie in Versuch 14. 20 ccm des Hydrolysats (entsprechend 1 g Casein, also 5proz. Hydrolysat) wurden mit 20 ccm einer *20proz. Phosphorwolframsäurelösung* gefällt und 2 Tage stehengelassen; sodann wurde durch ein trockenes Faltenfilter filtriert. 33 ccm des Filtrats (entspricht, unter Vernachlässigung des Volumens des Phosphorwolframsäureniederschlages, einem 2,5proz. Caseinhydrolysat) wurden mit 10 ccm einer 5proz. *Chininsulfatlösung* in 5proz. H_2SO_4 ausgefällt. Das Gemenge (entsprechend 43 ccm eines 1,9proz. Caseinhydrolysats) wurde durch ein trockenes Filter filtriert. 32 ccm dieses Filtrats wurden, zur Fällung des Chininüberschusses, mit 11 ccm einer 10proz. *Ammoniaklösung* versetzt (das Gemenge also entsprechend 43 ccm eines 1,4proz. Caseinhydrolysats). Durch ein trockenes Filter filtriert; 37 ccm des Filtrats wurden durch Zusatz von 20 ccm einer 10proz. *Schwefelsäure* angesäuert. Es resultierten so schließlich 57 ccm eines wasserhellen 0,9proz. Caseinhydrolysats X. Die Kolorimetrie wurde einerseits gegenüber einer 0,050proz., andererseits gegenüber einer 0,033proz. Tyrosinstandardlösung durchgeführt, und zwar in je drei Verdünnungsgraden des Caseinhydrolysats X, derart, daß im ganzen sechs Ablesungswerte resultierten:

	Standard	
	0,050 Proz. Tyrosin Proz.	0,033 Proz. Tyrosin Proz.
10 ccm Caseinhydrolysat + 0 ccm 5 proz. H_2SO_4	7,3	7,8
7 „ „ + 3 „ 5 „ H_2SO_4	6,0	7,0
5 „ „ + 5 „ 5 „ H_2SO_4	6,9	6,1
Mittel	6,8 Proz. Tyrosin im Casein	

15. Versuch.

Versuch analog dem Versuch 14 durchgeführt, mit der Abweichung jedoch, daß der Chininüberschuß statt mit Ammoniak, durch Fällung mit 10 ccm einer 30proz. *Natronlauge* entfernt wurde. Das Filtrat wurde mit 6 ccm einer 50proz. *Schwefelsäure* angesäuert. Es resultierten schließlich 40 ccm eines 1,2proz. Caseinhydrolysats. 12 kolorimetrische Versuche mit vier Verdünnungsgraden des Standard und drei Verdünnungsgraden des Hydrolysats.

Kolorimetrie	Standard			
	0,10 Proz. Proz.	0,08 Proz. Proz.	0,05 Proz. Proz.	0,03 Proz. Proz.
10 ccm Caseinhydrolysat unverdünnt. .	7,0	6,3	6,5	8,0
8 „ „ + 2 ccm 5proz. H_2SO_4	7,3	6,9	6,3	6,9
5 „ „ + 5 „ 5 „ H_2SO_4	6,1	6,6	5,9	6,8
Mittel	6,6 Proz. Tyrosin im Casein			

16. Versuch (ausgeführt von Josef Warkany). Bromadditionsverfahren.

Zur Kontrolle unserer Analysenwerte wurde eines der in der oben beschriebenen Art erhaltenen Caseinhydrolysate in bezug auf sein Bromadditionsvermögen nach der Methode von *Millon* in jener Modifikation, wie sie seinerzeit von *O. Fürth* und *W. Fleischmann* angegeben worden ist, geprüft[1]), d. h. Zusatz von m/30 $NaBrO_3$ zu der sauren, natriumbromidhaltigen Lösung bis zur dauernden Gelbfärbung, wobei die Bromaddition erfolgt. Der Bromüberschuß wird nach Zusatz von Natriumjodid und Stärkekleister mit n/10 Thiosulfat zurücktitriert.

Wenn uns dieses in reinen Tyrosinlösungen außerordentlich scharfe Titrationsverfahren bisher bei seiner Anwendung auf Proteinhydrolysate nicht befriedigt hatte, so lag das zum Teil daran, daß nach Fällung mit Phosphorwolframsäure und darauf folgender Beseitigung des Fällungsmittels mit *Ätzbaryt* bei der letztgenannten Prozedur Tyrosinverluste nur schwer vermieden werden können. Diese Schwierigkeit wird durch das *Chininverfahren* beseitigt.

Tatsächlich hat nunmehr *Warkany* bei zwei Caseinhydrolysen nach dem *Bromadditionsverfahren* in völliger Übereinstimmung mit unseren nach dem *Millonverfahren* ermittelten Werten für das Casein einen Tyrosingehalt von **6,8, 6,9 Proz.** ermittelt.

Wir wir später sehen werden, ist das Bromadditionsverfahren kein eindeutiges, insofern es Eiweißkörper gibt, welche bei der Hydrolyse auch nach Beseitigung aller durch Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen außer dem Tyrosin auch noch andere bromaddierende Körper enthalten. Dort aber, wo die Resultate der Bromaddition

[1]) *O. Fürth* und *Fleischmann*, diese Zeitschr. **127**, 143—145, 1922; *O. Fürth* (mit *J. Warkany*), ebendaselbst **146**, 265—267, 1924.

mit denjenigen der Millonkolorimetrie übereinstimmen, erscheint es als Kontrollverfahren sehr willkommen.

So erscheint immerhin hier bei der Analyse des *Hammarsten*schen Caseins die Übereinstimmung der Resultate von fünf verschiedenen Hydrolyseversuchen, wobei die Tyrosinbestimmung nach zwei grundverschiedenen Prinzipien (Millonkolorimetrie und Bromaddition) vorgenommen worden ist:

Millonkolorimetrie . . .	6,8	6,8	6,6 Proz. Tyrosin
Bromaddition	6,8	6,9	— „ „

als eine weitgehende und durchaus befriedigende[1]).

V. Versuche mit anderen Proteinen.

17. Versuch.

Wir haben zunächst durch einen Vorversuch festgestellt, ob zu einem *Gelatinehydrolysat zugesetztes Tyrosin* mit Hilfe des Verfahrens wiedergefunden werden kann. Ganz reine, tyrosinfreie Gelatine stand uns nicht zu Gebote. Eine Bestimmung mit dem benutzten Handelspräparate ergab darin einen Gehalt von 1,4 Proz. Tyrosin. Zu einem in bezug auf Gelatine 1proz. Gelatinhydrolysate wurde so viel Tyrosin zugesetzt, daß dasselbe in bezug auf zugesetztes Tyrosin 0,024proz. war. Demnach war 0,024 + 0,014 = 0,038 Proz. Tyrosin zu erwarten. Nach durchgeführter Analyse (Phosphorwolframsäure ⟶ Chinin ⟶ NaOH) wurde gefunden

bei $^{10}/_{10}$ Verdünnung . . .	0,040	0,035		Proz.
„ $^{7}/_{10}$ „ . . .	0,040	0,040	0,035	„

Demnach ausreichende Übereinstimmung.

A. Fibroin.

18. Versuch.

Wir wandten unsere Aufmerksamkeit nunmehr zunächst dem Seidenfibroin zu, da dieses Protein einerseits wegen des Fehlens mancher, die Bestimmung erschwerender Komponenten, andererseits wegen seines Reichtums an Tyrosin der Bestimmung von vornherein besonders günstige Bedingungen darbietet. So war es denn schon früher gelungen[2]),

---

[1]) *Frühere Analysen* hatten ergeben (vgl. die Tabelle bei *O. Fürth*, diese Zeitschr. 146, 272, 1924):

Kolorimetrisches Verfahren nach *Folin* und *Denis*	6,0 bis 6,5 Proz.
„ „ „ „ „ *Looney*	5,4 „ 5,5 „
Bromadditionsverfahren	4,1 „ 8,0 „
Diazoverfahren	5,2 „ 5,5 „
Millonverfahren nach *Weiss*	3,5 „ 5,6 „
„ „ *Thomas* (Indice phénolique)	8,5 „
Gravimetrische Bestimmung früherer Autoren	4,5 „

[2]) Vgl. *O. Fürth* und *W. Fleischmann*, diese Zeitschr. 127, 148, 1922.

beim Seidenfibroin mit vier auf grundverschiedenen Prinzipien basierenden Methoden übereinstimmende Werte zu erzielen:

Gravimetrische Bestimmung	10,5	Proz.	Tyrosin
Folin-Denis-Bestimmung	11,0	,,	,,
Bromadditionsbestimmung.	11,0	,,	,,
Diazobestimmung	10,0	,,	,,

Die Kontrolle des neuen Verfahrens an der Hand des Fibroins hat uns nun auf eine wichtige Fehlerquelle desselben aufmerksam gemacht. Es hat sich beim Fibroin herausgestellt, daß, wenn man zur Kolorimetrie Hydrolysate von allzu hohem Tyrosingehalt verwendet, man unter Umständen viel zu hohe Werte erhalten kann. Man kann diesem Übelstand dadurch begegnen, daß man Serienversuche mit steigenden Verdünnungen vornimmt und sich überzeugt, daß weitere Verdünnung kein weiteres Absinken des Kolorimeterwertes bewirkt.

Fibroinhydrolysat nach Vorbehandlung mit Phosphorwolframsäure—Chinin—NaOH, in bezug auf Fibroin 1,8 proz. Verdünnung.

	Gegenw. Tyrosinstandard		
	0,10 Proz. Proz.	0,07 Proz. Proz.	0,05 Proz. Proz.
5 ccm Hydrolysat + 5 ccm 5 proz. H_2SO_4	15,0	15,4	—
2 ,, ,, + 8 ,, 5 ,, H_2SO_4	10	11	11
	Tyrosin im Fibroin		

19. Versuch.

Neues Fibroinhydrolysat nach Vorbehandlung in bezug auf 1 proz. Fibroin:

unverdünnt	18			Proz.	Tyrosin	
½ verdünnt	14	14	14	,,	,,	
$^3/_{10}$,, ...	11	10		,,	,,	im Fibroin
$^2/_{10}$,, ...	10	10		,,	,,	,, ,,

Dasselbe Hydrolysat, von Herrn *Warkany* in bezug auf sein *Bromadditionsvermögen* geprüft, ergab einen Tyrosingehalt des Fibroins von **10 Proz.** Eine neue Vorbehandlung desselben Hydrolysats **9,4, 9,4 Proz.** Tyrosin.

B. Fibrin.

Die bisher in bezug auf den Tyrosingehalt des Fibrins von verschiedenen Autoren mit verschiedenen Methoden erzielten Werte erscheinen so widersprechend[1]), daß überhaupt nichts Bestimmtes über diesen Gegenstand ausgesagt werden konnte.

20. Versuch.

Fibrinhydrolyse mit Schwefelsäure wie oben. Die Phosphorwolframsäurefällung wurde derart ausgeführt, daß auf je 1 g Eiweiß 40 ccm einer

[1]) Vgl. *O. Fürth*, Tabelle, diese Zeitschr. **146**, 272, 1924.

20proz. Phosphorwolframsäurelösung angewandt wurden, und daß die Flüssigkeit nach Phosphorwolframsäurezusatz 5 Proz. H_2SO_4 enthielt. Behandlung mit Chinin, dann mit NaOH wie früher.

Kolorimetrie:

a) Hydrolysat in bezug auf 0,62proz. Fibrin:
unverdünnt . . . . 4,0 Proz. Tyrosin im Fibrin
5/10 verdünnt . . . . . . 4,7 „ „ „ „
b) Hydrolysat in bezug auf 0,70proz. Fibrin:
unverdünnt . . . . 4,0 Proz. Tyrosin im Fibrin
8/10 verdünnt . . . . . . 4,0 „ „ „ „
5/10 „ . . . . . . 4,0 „ „ „ „
c) Hydrolysat in bezug auf 0,90proz. Fibrin:
unverdünnt . . . . . 4,9, 5,0 Proz. Tyrosin im Fibrin
7/10 verdünnt . . . . 4,3, 4,7 „ „ „ „
d) neues Hydrolysat in bezug auf 0,97proz. Fibrin:
unverdünnt . . . . . 4,5, 4,5 Proz. Tyrosin im Fibrin
7/10 verdünnt . . . . 4,3, 4,3 „ „ „ „
5/10 „ . . . . 4,1, 4,1 „ „ „ „

} **Mittel 4,4 Proz.**

21. Versuch.

Analoger Versuch. Die Kolorimetrie ergab: **4,5 bis 4,8 Proz.** im Fibrin. Bromaddition (*Warkany*): **4,9 Proz.**

Die Übereinstimmung ist sonach eine befriedigende; dem resultierenden Wert von **4,0** bis **4,9 Proz.** stehen manche der älteren Angaben nahe:

Gravimetrische Bestimmungen von *P. A. Levene* und *van Slyke*, Maximum . . . . 3,8 Proz.
Millonverfahren nach *M. Weiss* . . . . 4,0 „
Diazoverfahren (*Hanke* und *Kössler*) . . . . 4,7 „
Bromadditionsverfahren (*Fürth-Fleischmann*) . . . . . 4,7 „

C. Hämoglobin.

22. Versuch.

Das Ausgangsmaterial war schön kristallisiertes, nach dem Ammonsulfatverfahren aus Pferdeblut gewonnenes, sodann koaguliertes und gründlich durch Auskochen gereinigtes Hämoglobin. Vorgang wie bei B.

Kolorimetrie eines 1proz. Hydrolysats:

unverdünnt . . . . . . 3,1, 3,0 Proz. Tyrosin im Hämoglobin
7/10 verdünnt . . . . 3,0 „ „ „ „
5/10 „ . . . . 2,6 „ „ „ „
Bromaddition . . . . 2,5 „
2,7 „
Dieselbe Hydrolyse; Kolorimetrie eines 1,2proz. Hydrolysats
unverdünnt . . . . 3,0 Proz. Tyrosin im Hämoglobin
7/10 verdünnt . . . . 2,8 „ „ „ „
5/10 „ . . . . . 2,6, 2,7 „ „ „ „

} Mittel **2,8 Proz.** Tyrosin

U. Kijotaki[1]) hatte bei sorgfältigen, in diesem Laboratorium an zahlreichen Globin- und Hämoglobinpräparaten nach dem Brom-

[1]) Diese Zeitschr. **134**, 331, 1922.

additionsverfahren durchgeführten Analysen Werte von 2,8 bis 3,7 Proz. erhalten, die sich von unserem Mittelwert von 2,8 Proz. nicht allzu weit entfernen.

D. Edestin.

23. Versuch.

Kristallisiertes Präparat aus Hanfsamen. Kolorimetrie eines 1,25proz. Hydrolysats in

$^5/_{10}$-Verdünnung . . . . 4,3, 4,3 Proz. Tyrosin im Edestin
Bromaddition . . . . . 4,9 „

E. Serumalbumin.

24. Versuch.

a) Kolorimetrie einer 1,0proz. Lösung:

$^7/_{10}$-Verdünnung . . . . 5,0, 4,7 } 5,0 Proz. Tyrosin im Serumalbumin
$^5/_{10}$ „ . . . . 5,2, 5,4 }
Bromaddition (*Warkany*) 6,0 Proz.

b) Kolorimetrie einer 1,1proz. Lösung:

unverdünnt . . . . . . 4,0, 3,8, 4,5 Proz. } 4,0 Proz. Tyrosin im Serumalbumin
$^7/_{10}$-Verdünnung . . . . 3,7, 4,0, „ }
$^5/_{10}$ „ . . . . 4,1 „
Bromaddition . . . . . 5,4 Proz.

Während also die früher ausgeführten Präparate eine gute Übereinstimmung zwischen den Resultaten der Millonkolorimetrie und der Bromaddition ergeben hatten, bestand hier eine Spannung von etwa 1 Proz. zugunsten der letzteren Methode. *Kijotaki* (l. c.) hatte in diesem Laboratorium beim Serumalbumin Bromadditionswerte von 5,5 bis 5,9 Proz. erhalten; *Folin-Denis* nach dem Kolorimetrieverfahren 4,8 Proz.

F. Serumglobulin.

25. Versuch.

Kolorimetrie einer 1,4proz. Lösung in

$^5/_{10}$-Verdünnung . . . . 4,8, 4,4 } **4,6 Proz.** Tyrosin im Serumglobulin
$^3/_{10}$ „ . . . . 4,5, 4,5 }

Bromaddition.

a) vorbehandeltes Hydrolysat, direkt . . . 6,4 Proz. }
b) dasselbe nach Petrolätherausschüttelung bei saurer Reaktion . . . . 6,5, 7,0 „ } 6,8 Proz.
c) dasselbe nach Wasserdampfdestillation bei saurer Reaktion . . . . 6,4, 7,5 „ }

Hier beträgt also das Plus zugunsten der Bromaddition etwa 2 Proz. Es ist nicht gelungen, jene störende Substanz, welche offenbar ebenso wie das Tyrosin auch befähigt ist, Brom zu addieren, aus dem Hydrolysat durch *Ausschüttelung* mit Petroläther oder durch *Wasserdampfdestillation* bei saurer Reaktion zu entfernen. *Kijotaki* (l. c.) hatte in diesem Laboratorium früher Bromadditionswerte entsprechend 5,7 bis 7,5 Proz. erhalten.

G. Ovalbumin.

26. Versuch.

(Käufliches Präparat, welches als ein Gemenge aller Proteine des Eierklars zu betrachten ist.)

a) Kolorimetrie eines 1,3 proz. Hydrolysats:

unverdünnt	4,5 Proz.	4,2 Proz. Tyrosin
5/10 verdünnt . . .	4,2 „	
3/10 „ . . .	4,0 „	

b) Kolorimetrie eines 1,15 proz. Hydrolysats:

		Dasselbe Hydrolysat nach Ausschüttelung mit Petroläther bei saurer Reaktion	
unverdünnt	4,0 Proz.	4,3 Proz.	**3,8 Proz.** Tyrosin
7/10 verdünnt . . .	3,7, 3,4 „	4,0 „	
5/10 „	3,3 „		
Bromaddition . . .	7,2, 7,3 „		

In diesem Falle betrug also der Bromadditionswert nahezu das Doppelte des kolorimetrischen Wertes.

Da das Ovalbumin anderen Proteinen gegenüber durch seinen hohen Gehalt an einem *Kohlehydratkomplex* ausgezeichnet ist, ergab sich die Frage, ob nicht vielleicht dieser letztere, das Glucosamin, jene Substanz sei, welche dieses Plus verschuldet. Von diesem Gesichtspunkte aus wurde ein Protein untersucht, das an diesem Komplex noch reicher ist, nämlich das

H. Pseudomucin.

27. Versuch.

Aus frischem Ovarialcysten-Inhalte mit Alkohol gefällt, mit Petroläther extrahiert.

Kolorimetrie einer 1,27 proz. Lösung:

unverdünnt	3,5 Proz.	**3,1 Proz.**
7/10 verdünnt 3,1,	3,1 „	
5/10 „	2,9 „	

Bromaddition direkt	5,0, 5,1 Proz.
nach Ausschüttelung bei alkalischer Reaktion . .	4,7 „
„ „ „ saurer „ . .	6,0 „ (?)

Das Plus war hier also nicht größer als in den obigen Fällen, trotzdem es sich um eine sehr kohlehydratreiche Substanz gehandelt hat. Auch haben wir, um uns über diesen Punkt ganz ins klare zu kommen, *Casein bei Gegenwart von Rohrzucker hydrolysiert.* Es ergab sich nun nicht nur keine Zunahme des normalen Bromadditionswertes (6,8 Proz. Tyrosin), sondern umgekehrt ein Absinken desselben auf 4,6 bis 5,4 Proz., offenbar darum, weil etwas Tyrosin bei der Hydrolyse infolge der (durch die Gegenwart von Zucker gesteigerten) Huminbildung zugrunde gegangen war.

Es liegt also kein Grund dafür vor, den *Kohlehydratkomplex* der Proteine für das Plus an Brombindungsvermögen verantwortlich zu machen.

I. Keratin aus Federn.

Schon bei früheren Versuchen (*Fürth* und *Fleischmann*, l. c., S. 145) waren die ganz unwahrscheinlich hohen Werte aufgefallen, welche Keratin aus *Horn* bei der Bromadditionsbestimmung liefert (entsprechend 7 bis 10 Proz. Tyrosin).

Als reines Material für unsere Versuche wählten wir das Keratin aus *Federn*.

28. Versuch.

Kolorimetrie eines 1,4proz. Hydrolysats:

unverdünnt	3,6,	3,6 Proz. Tyrosin	**3,2 Proz.**
$^5/_{10}$ verdünnt	3,0,	3,0 „ „	
$^3/_{10}$ „		3,0 „ „	

Dagegen ergab die von Herrn *Warkany* durchgeführte *Bromadditionsbestimmung* 7,9 Proz.

Da sich bei der Hydrolyse das Auftreten von hohen Fettsäuren bemerkbar gemacht hatte, wurde der Versuch nach vorausgegangener Ätherextraktion des Ausgangsmaterials wiederholt. Nunmehr ergab die *Kolorimetrie*:

unverdünnt		3,3 Proz.	**2,9 Proz.** Tyrosin
$^7/_{10}$ verdünnt		3,0 „	
$^5/_{10}$ „	2,7,	2,7 „	

Bei einer neuen Portion des Hydrolysats ergab nach Vorbehandlung die *Bromaddition* entsprechend 5,1, 5,1 Proz.; dasselbe nach Ausschüttelung mit Petroläther: 4,3, 3,9 Proz. Tyrosin.

29. Versuch. Neue Hydrolyse von entfettetem Keratin aus Federn:

Bromadditin (*Warkany*) direkt	6,8, 7,7 Proz.	6,5 Proz. Tyrosin
nach Ausschüttelung mit Petroläther bei saurer Reaktion	6,6, 6,5 „	
nach Ausschüttelung mit Petroläther bei alkalischer Reaktion	6,0 „	
nach Wasserdampfdestillation bei saurer Reaktion	7,8 „	
„ „ „ alkalischer „	6,3 „	

Die unbekannte, mit Petroläther weder bei saurer noch bei alkalischer Reaktion extrahierbare und mit Wasserdämpfen weder bei saurer noch bei alkalischer Reaktion flüchtige Substanz, welche die Bromadditionsbestimmung fälscht, ist also im Keratinhydrolysat in reichlichen Mengen enthalten. Um das im Keratin in reichlichen Mengen enthaltene *Cystin* als solches kann es sich nicht handeln, da dieses ja, zum mindesten bei längerem Stehen, aus schwefelsaurer Lösung von Phosphorwolframsäure gefällt wird. Ob es sich etwa um ein bei der Hydrolyse entstandenes Spaltungsprodukt des Cystins handle, wie *Plimmer* (l. c.) meint, vermögen wir zurzeit nicht zu entscheiden.

Wir ersehen jedenfalls so viel, daß das Bromadditionsverfahren nicht direkt für die Tyrosinbestimmung verwendbar ist; dasselbe kann nur dort, wo Millonkolorimetrie und Bromadditionsverfahren übereinstimmende Werte geben, zur Unterstützung der ersteren dienen.

VI. Methodik der Tyrosinbestimmung.

Derjenige Vorgang der Tyrosinbestimmung, der uns zurzeit am besten fundiert erscheint, wäre etwa folgender:

2,5 g trockenes Eiweiß werden mit 3,5 ccm konzentrierter H_2SO_4 und 22,5 ccm H_2O 12 Stunden lang in einem Hartglaskölbchen mit aufgesetztem Rückflußkühler in langsamem Sieden erhalten. Sodann wird in einem Meßkolben auf 50 ccm aufgefüllt, derart, daß das Hydrolysat in bezug auf Eiweiß 5proz. ist. 20 ccm dieses Hydrolysats (entsprechend 1 g Protein) werden in einem Meßzylinder durch Zugabe von 20 bis 40 ccm Phosphorwolframsäure (20proz.) vollständig ausgefällt und nach eintägigem Stehen, nachdem der Niederschlag sich vollkommen abgesetzt hat, durch ein trockenes, nicht zu großes Faltenfilter filtriert. Das klare, abgemessene Filtrat wird durch Zusatz von 5proz. *Chininsulfatlösung* in 5proz. Schwefelsäure unter Vermeidung eines unnötigen Überschusses vollständig gefällt. Die Flüssigkeit wird wieder abgemessen, durch ein trockenes kleines Faltenfilter in einen Meßzylinder hineinfiltriert und der Chininüberschuß durch Zusatz einiger Kubikzentimeter einer 30proz. Natronlauge ausgefällt. Das Volumen wird neuerlich abgemessen, durch ein trockenes Filter filtriert und das Filtrat schließlich durch Zusatz von einigen Kubikzentimetern 50proz. *Schwefelsäure* gegen Lackmuspapier schwach sauer gemacht.

Die Durchführung der dreimaligen Filtration aliquoter Teile und die entsprechende Umrechnung erfordert natürlich, um grobe Irrtümer zu vermeiden, einige Aufmerksamkeit. Um das Hydrolysat nicht unnötig zu verdünnen, wird man keinen unnötigen Überschuß der Fällungsmittel anwenden, um durch das trockene Filter nicht etwa nur einen kleinen Teil, sondern immerhin die Hauptmenge der Flüssigkeit abfließen zu lassen. Es ist dringend zu raten, die *Umrechnung* der Konzentration des Hydrolysats in bezug auf das Ausgangseiweiß nicht erst am Schluß vorzunehmen, sondern in jeder einzelnen Phase, und das Resultat mittels einer Etikette auf dem die betreffende Fraktion enthaltenden Gefäß sogleich zu vermerken. Wurden also z. B. 20 ccm eines 5proz. Caseinhydrolysats mit 20 ccm Phosphorwolframsäure gefällt, so ist das Filtrat nunmehr in bezug auf Casein 2,5proz. (vgl. als Beispiel Versuch 14).

Das schließlich resultierende vorbehandelte Hydrolysat soll in bezug auf das ursprüngliche Eiweiß am besten 1- bis 2proz. sein. Handelt es sich z. B. um ein Protein, das 5 Proz. Tyrosin enthält, so würde

ein in bezug auf dieses Protein 1proz. Hydrolysat einer 0,05proz. Tyrosinlösung entsprechen; bei der Kolorimetrie müßte also eine 0,10proz. Tyrosin-Standardlösung auf die Hälfte verdünnt werden, um die gleiche Farbentiefe zu geben.

Die *Kolorimetrie* wird nun einfach in der Weise durchgeführt, daß je 10 ccm vom Hydrolysat und der Tyrosin-Standardlösung mit je 2 ccm *Millon*scher Lösung (Bereitung s. S. 3) versetzt und bei Zimmertemperatur bis zum Eintritt der maximalen Färbung stehengelassen werden. Der kolorimetrische Vergleich geschieht bequem durch ein Dubosqkolorimeter. Als Ausgangsstandard dient eine 0,1proz. Lösung von reinem Tyrosin in 5proz. Schwefelsäure. Dieselbe hat das Maximum ihrer Färbung meist nach $^{3}/_{4}$ Stunden erreicht[1]), die Färbung des Hydrolysats wird ebenfalls nach $^{3}/_{4}$ Stunden maximal. Das Maximum muß sich bei völliger Klarheit einige Zeitlang halten. Versuche, die schnell eine Trübung geben, sind zu verwerfen. Ein auf Zusatz der *Millon*schen Lösung entstehender weißer Salzniederschlag, der sich innerhalb kurzer Zeit absetzt, während die Flüssigkeit darüber klar bleibt, stört die Bestimmung weiter nicht. Eventuell kann der Niederschlag vor der Bestimmung abfiltriert werden.

Man soll es nie unterlassen (vgl. obige Versuche, insbesondere Versuch 18 und 19), Serienversuche zu machen und das Hydrolysat mehrfach verdünnt zu untersuchen [etwa a) unverdünnt, b) $^{5}/_{10}$ verdünnt, c) $^{2}/_{10}$ verdünnt]. Sehr empfehlenswert ist es auch überdies, die *Tyrosin-Standardlösung in verschiedenen Verdünnungsgraden* (Verdünnung mit 5proz. H_2SO_4) anzuwenden: etwa 0,10, 0,07, 0,05 und 0,03 Proz. Tyrosin (vgl. Versuch 4).

Sinken die gefundenen Werte mit zunehmender Verdünnung des Hydrolysats ab und stellen sich auf ein bestimmtes niederes Niveau ein, wie es nur beim Fibroin beobachtet worden ist, *so sind die niederen Werte als die richtigen zu betrachten.*

Bromadditionsverfahren. Will man die Ergebnisse der Millonkolorimetrie durch das, wie wir gesehen haben, allerdings nichts weniger als eindeutige Bromadditionsverfahren ergänzen, so wird man eine andere Fraktion jenes durch das Phosphorwolframsäure—Chinin—Natronlaugeverfahren erhaltenen neutralisierten Filtrats zur Bromadditionsbestimmung nach dem Vorgang von *Millon* (vgl. *Fürth* und *Fleischmann*, l. c., S. 143 bis 145) verwenden. Man würde z. B. 70 ccm des Filtrats, die 2 g des ursprünglichen Proteins entsprechen, mit

[1]) Es verhalten sich diesbezüglich nicht alle Tyrosinpräparate völlig gleich, was offenbar mit der An- oder Abwesenheit katalysierender Beimengungen zusammenhängt. Man wird sich durch Vorversuche orientieren und die Versuche eben so ansetzen, daß Standard und Hydrolysat ungefähr gleichzeitig ihr Färbungsmaximum erreichen.

70 ccm konzentrierter *Salzsäure* und 30 ccm 2proz. *Natriumbromid* versetzen. Sodann läßt man aus einer Bürette 15 ccm m/30 *Natriumbromatlösung* hinzufließen, bis dauernde Gelbfärbung einen Bromüberschuß anzeigt. Nunmehr wird man, um diesen zu ermitteln, 10 ccm einer 4proz. Natriumjodidlösung nebst Stärkekleister hinzufügen und mit n/10 Thiosulfat zurücktitrieren: Verbrauch 2,2 ccm n/10 Thiosulfat.

15 × 2 = 30,0 ccm n/10 Brom
— 2,2 „ n/10 „
27,8 ccm n/10 Brom
27,8 × 0,008 = 0,2224 g Brom.

Da *1 g Tyrosin 1,80 g Brom verbraucht*, entspricht dies ($x : 0{,}2224 = 1 : 1{,}8$) einer Menge von 0,124 g Tyrosin in 2 g Casein oder 0,062 g Tyrosin in 1 g Casein, das ist: der Tyrosingehalt des Caseins entspricht **6,2 Proz.**

Bei genauem Arbeiten würde auch die halbe Menge Casein (entsprechend 1 g), ja sogar auch noch ½ g Casein für die Bestimmung genügen, da der Titrationsausschlag dann noch immer etwa 7 ccm n/10 Brom beträgt. Steht jedoch Proteinmaterial ausreichend zur Verfügung, so wird man am bequemsten arbeiten, wenn man statt 2,5 g Eiweiß 5 g Eiweiß hydrolysiert und statt auf 50 ccm auf 100 ccm auffüllt, derart, daß man Material für mehrere Parallelbestimmungen hat.

Auf der anderen Seite kann man für die Kolorimetrie auch mit weit weniger als 2,5 g Eiweiß mutatis mutandis sehr wohl auskommen, und dürfte es im Bedarfsfalle nicht schwer fallen, die Millonkolorimetrie zu einem richtigen *Mikrobestimmungsverfahren* umzugestalten.

VII. Tyrosinabspaltung aus Proteinen unter Einwirkung des Trypsins sowie der Alkalihydrolyse.

Wir haben die aus dem neuen Verfahren sich ergebende Möglichkeit der quantitativen Bestimmung von *freiem* neben *proteingebundenem* (durch Phosphorwolframsäure fällbaren) *Tyrosin* benutzt, um an einigen Beispielen die Tyrosinabspaltung durch Trypsin bzw. durch Alkalihydrolyse zu studieren.

30. Versuch. Casein, Trypsinverdauung.

50 g Casein Hammarsten wurden in 50 ccm n/1 NaOH gelöst[1]). Klare Lösung bei kurzdauerndem Erwärmen am Wasserbade. Da die Lösung sich jedoch gegen Phenolphthalein alkalisch erwies, wurde so lange n/1 H_2SO_4 hinzugefügt, bis Methylrot den Neutralpunkt anzeigt. Nunmehr fiel das Casein anscheinend quantitativ wieder aus. Jetzt wurden wieder 50 ccm n/1 NaOH zugesetzt. Klare Lösung wurde im Wasserbade erzielt;

[1]) Nach den Angaben in Abderhaldens Biochemischem Handlexikon verbraucht 1 g Casein 8,3 bis 9,5 ccm n/10 NaOH.

dieselbe erschien nunmehr gegen Rosolsäure und Methylrot alkalisch, gegenüber Phenolphthalein aber sauer, daher p_H 7 bis 8. Es wurde auf ½ Liter aufgefüllt und 1 g eines sehr kräftig wirksamen Trypsinpräparats (von *Röhm* und *Haas* in Darmstadt) sowie etwas Toluol hinzugefügt und in den Brutofen gestellt.

Bereits am nächsten Tage kündigte eine ziemliche Abscheidung körniger Drusen am Boden und an der Oberfläche der Flüssigkeit die erfolgte Abspaltung von Tyrosin an. Es wurden nach kräftigem Durchschütteln (um eine möglichst gleichmäßige Suspension zu erzielen) unfiltrierte Proben entnommen.

a) 5 ccm der Suspension (entsprechend 0,5 g Casein) verbrauchten bis zur Neutralisation gegen Phenolphthalein 5,0 ccm n/10 NaOH. Nach Zusatz von 5 ccm (gegen Phenolphthalein neutralisierten) *Formaldehyds* erschien die Flüssigkeit wieder stark sauer und erforderte nunmehr zur Neutralisation gegenüber Phenolphthalein weitere 8,1 ccm n/10 NaOH. Der *formoltitrierbare N* betrug also nunmehr (8,1 × 0,0014 =) 0,0113 g N für ½ g Casein oder 0,0226 g N für 1 g Casein, das ist **16,1 Proz.** des Gesamt-N.

b) *Tyrosinbestimmung*: 10 ccm obiger Suspension (entsprechend 1 g Casein) wurden mit 10 ccm 10proz. H_2SO_4 versetzt, wobei die weißen Kristallkörner in Lösung gingen. Es wurden nunmehr 20 ccm 20proz. Phosphorwolframsäure hinzugefügt. Weiterer Vorgang (Chinin, Natronlauge) wie gewöhnlich. Die Millonkolorimetrie ergab auf Casein berechnet **4,0 Proz. freies, nicht durch Phosphorwolframsäure fällbares Tyrosin.** Bewertet man den Tyrosingehalt des Caseins mit 6,8 Proz., so entspricht dies 59 Proz. der Gesamtmenge des Tyrosins.

2 Tage später hatte die Menge des formolbaren N ein wenig, auf **17,8 Proz.** des Gesamt-N, die Menge des freien Tyrosins auf **4,6 Proz.** (d. s. 67 Proz. des Gesamttyrosins) zugenommen.

Trotz weiteren Zusatzes von 1 g Pankreatin Rhenania war im Verlaufe von weiteren 3 Tagen keine weitere Zunahme des formoltitrierbaren N zu erzielen.

Es war hier also tatsächlich die Tyrosinabspaltung aus dem Proteinmolekül der allgemeinen Desintegration des letzteren weit vorangeeilt. Bereits nach einem Tage, wo nur etwa $^1/_6$ des Gesamt-N als formoltitrierbar, d. h. in Form freier Aminosäuren vorhanden, nachweisbar war, waren bereits etwa zwei Drittel des vorhandenen Tyrosins in freier Form abgespalten worden.

31. Versuch. Casein, Pepsin-Trypsinverdauung.

20 g Casein Hammarsten mit 200 ccm 0,4proz. HCl + 1 g Pepsin angesetzt. 2 Tage später mit so viel Natronlauge versetzt, daß Phenolphthalein nur eben eine alkalische Reaktion anzeigt; dazu 2 ccm 10proz. Ammoniak und 1 g Pankreatin Rhenania.

Nach 1 Tage ergab *Sörensen* 14 Proz. des Gesamt-N als freien Ammoniak-N.
Freies Tyrosin bezogen auf Casein **8,8 Proz.**

Nach 2 Tagen ergab *Sörensen* 19 Proz. des Gesamt-N als freien Ammoniak-N.
Freies Tyrosin bezogen auf Casein **5,5 Proz.**

Nach 4 Tagen ergab *Sörensen* 21 Proz. des Gesamt-N als freien Ammoniak-N.
Freies Tyrosin bezogen auf Casein **5,5 Proz.**

Nach 5 Tagen ergab *Sörensen* 22 Proz. des Gesamt-N als freien Ammoniak-N.
Freies Tyrosin bezogen auf Casein **5,5 Proz.**

Nach 6 Tagen ergab *Sörensen* 21 Proz. des Gesamt-N als freien Ammoniak-N.
Freies Tyrosin bezogen auf Casein **5,5 Proz.**

Die Verdauung war also bereits nach wenigen Tagen völlig zum Stillstand gekommen, nachdem nur etwa ein Fünftel des Gesamt-N in formoltitrierbaren N übergeführt war. Gleichzeitig aber waren von den 6,8 Proz. des Tyrosins 5,5 Proz. Casein, das sind 81 Proz. oder vier Fünftel bereits in Freiheit gesetzt worden.

32. Versuch. Casein; milde Alkalieinwirkung.

10 g Casein Hammarsten in 200 ccm 5proz. NaOH suspendiert. Im Brutofen bei 40° erfolgte völlige Lösung. Nach 2 Tagen bei 40° und weiteren 3 Tagen bei 60° ergab *Sörensen* 18 Proz. des Gesamt-N. Freies Tyrosin war nur zu **1,4 Proz.**, also etwa einem Fünftel des Gesamt-N enthalten.

33. Versuch. Casein; eingreifende Alkalihydrolyse.

10 g Casein Hammarsten in 200 ccm 30proz. Natronlauge 1 Stunde am Wasserbade gelöst:

Nach 1 Stunde bei 100°: *Sörensen* 21 Proz. N vom Gesamt-N; freies Tyrosin **1,6 Proz.** des Caseins = 24 Proz. des Gesamttyrosins.
Nach 1 Tage bei 60°: *Sörensen* 36 Proz. N vom Gesamt-N; freies Tyrosin **6,8 Proz.** des Caseins = 100 Proz. des Gesamttyrosins.
Nach 3 Tagen bei 60°: *Sörensen* 44 Proz. N vom Gesamt-N; freies Tyrosin **6,8 Proz.** des Caseins = 100° des Gesamttyrosins.

Nach 2 Stunden bei 100° nud weiter einem Tage bei 60° war also, während nur etwa ein Drittel des Gesamt-N formoltitrierbar geworden war, bereits die Gesamtheit des vorhandenen Tyrosins im freien Zustande nachweisbar.

34. Versuch. Fibrin; milde Alkalieinwirkung.

17,6 g Fibrin in 352 ccm 5proz. NaOH durch Stehen über Nacht bei 40° in Lösung gebracht; trübe Lösung. Fibringehalt auf Grund von Kjeldahlbestimmung ermittelt.

Nach 1 Tage bei 40°: *Sörensen* 7 Proz. vom Gesamt-N.
Nach 3 Tagen bei 40°: *Sörensen* 17 Proz. vom Gesamt-N; freies Tyrosin **1 Proz.** des Fibrins = 22 Proz. des Gesamttyrosins.
Nach 6 Tagen bei 40°: *Sörensen* 47 Proz. vom Gesamt-N; freies Tyrosin **4,8 Proz.** des Fibrins = 100 Proz. des Gesamttyrosins.

35. Versuch. Fibrin; eingreifende Alkalihydrolyse.

10 g Fibrin mit 30proz. Kalilauge unter Rückflußkühlung gekocht:

Nach 1 Stunde: *Sörensen* 30 Proz. des Gesamt-N; freies Tyrosin **1,7 Proz.** des Fibrin = 35 Proz. des Gesamt-N.
Nach 2 Stunden: *Sörensen* 34 Proz. des Gesamt-N; freies Tyrosin ?
Nach 4 Stunden: *Sörensen* 35 Proz. des Gesamt-N; freies Tyrosin ?
Nach 5 Stunden: *Sörensen* 34 Proz. des Gesamt-N; freis Tyrosin **4,7 Proz.** des Fibrins = annähernd 100 Proz. des Gesamt-N.

Es ist sonach gelungen, die Gesamtheit des vorhandenen Tyrosins einerseits durch sechstägiges Erwärmen auf 40°, andererseits aber durch fünfstündiges Kochen mit 30proz. Kalilauge in Freiheit zu setzen. Es bestätigt sich sonach die Annahme, daß das Tyrosin sozusagen eine „*periphere*" *Lage im Proteinmolekül* einnehme und daß sowohl bei der Einwirkung tryptischer Fermente, als auch bei der Alkalihydrolyse die Infreiheitsetzung des Tyrosins der totalen, durch Freiwerden formoltitrierbarer Aminogruppen gekennzeichneten Desintegration ganz erheblich voraneile.

Es sei uns gestattet, an dieser Stelle Herrn *Josef Warkany* für die werktätige Unterstützung bei dieser Untersuchung durch Ausführung zahlreicher Bromadditionsbestimmungen unseren herzlichsten Dank auszusprechen.

VIII. Zusammenfassung.

1. Aus früheren Untersuchungen hatte sich ergeben, daß keine der bisher für die Ermittlung des Tyrosingehaltes von Proteinen versuchten Methoden, welche auf der *Diazoreaktion*, der *Bromaddition*, der *Farbenreaktion mit Phosphormolybdänsäure*, der *Millonreaktion* und der *gravimetrischen Bestimmung* beruhten, imstande ist, einwandsfreie und zuverlässige Resultate zu liefern.

2. Unter den genannten Methoden verdient die kolorimetrische Auswertung der *Millonschen Reaktion*, die zuerst von *M. Weiss* versucht worden ist, wegen ihrer Spezifizität besondere Beachtung. Die Schwierigkeit, daß Millonproben beim Erwärmen stets Niederschlagsbildungen liefern, wobei der rote Farbstoff unlöslich ausfällt, kann nach *Pierre Thomas* dadurch umgangen werden, daß man die Reaktion, statt schnell durch Erwärmen, sich langsam bei Zimmertemperatur entwickeln läßt. Jedoch erscheint die erste Vorbedingung einer Millonkolorimetrie, nämlich eine restlose Beseitigung aller durch das Reagens direkt aus den Hydrolysaten fällbarer Eiweißspaltungsprodukte, durch die genannte Methodik nicht ausreichend gewährleistet. Insbesondere erscheint eine Vorfällung mit *Mercurinitrat* (ebenso wie auch mit *Mercurisulfat*) aus dem Grunde untunlich, weil diese Reagenzien den Ablauf der *Millon*schen Reaktion ihrerseits in undefinierbarer Weise katalysierend beeinflussen. Auch ein Überschuß von Mineralsäure erscheint für den Ablauf der Reaktion nicht ganz gleichgültig.

3. *Versuche an reinen Tyrosinlösungen* haben dargetan, daß die *Millon*sche Reaktion, wenn man dieselbe unter ganz bestimmten Bedingungen bei Zimmertemperatur sich abspielen läßt, tatsächlich die Möglichkeit eröffnet, die Konzentration von reinen Tyrosinlösungen mit einer für physiologische Zwecke ausreichenden Genauigkeit zu ermitteln.

4. Handelt es sich um die Ermittlung des Tyrosins in *Eiweißhydrolysaten*, so wird die Beseitigung von störenden Beimengungen am zweckmäßigsten in der Weise bewerkstelligt, daß man das schwefelsaure Hydrolysat mit *Phosphorwolframsäure* ausfällt, den Überschuß des Fällungsmittels mit *Chininsulfatlösung*, den Chininüberschuß mit *Natronlauge* beseitigt und das letzte Filtrat neutralisiert. Man erhält so klare wasserhelle Flüssigkeiten, in denen man den Tyrosingehalt ohne weiteres durch *Millonkolorimetrie* unter Anwendung einer 0,1 proz. Tyrosinlösung in 5 proz. Schwefelsäure als Standard ermitteln kann.

5. In einem in dieser Weise von störenden Beimengungen befreiten Hydrolysat kann man auch das *Bromadditionsvermögen* (nach *Millar* in der Modifikation von *Fürth* und *Fleischmann*) ermitteln: Zusatz von m/30 Natriumbromatlösung zu der sauren, natriumbromidhaltigen Lösung bis zur dauernden Gelbfärbung, wobei die Bromaddition erfolgt. Der Bromüberschuß wird nach Zusatz von Natriumjodid und Stärkekleister mit n/10 Thiosulfat zurücktitriert (1 g Tyrosin verbraucht 1,80 g Brom).

6. Während bei einer Reihe von Eiweißkörpern (wie dem Casein, Fibroin, Fibrin, Hämoglobin, Edestin) die der Millonkolorimetrie und aus der Bromaddition errechneten Tyrosinwerte übereinstimmen, enthalten vorbehandelte Hydrolysate anderer Eiweißkörper (wie Keratin, Serumalbumin und Globulin, Ovalbumin und Pseudomucin) außer dem Tyrosin noch *andere brombindende Bestandteile unbekannter Art*, die durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt und weder bei saurer noch bei alkalischer Reaktion mit Petroläther extrahierbar oder mit Wasserdämpfen flüchtig sind. Das Bromadditionsverfahren ist sonach nicht direkt für die Tyrosinbestimmung verwertbar und kann nur dort, wo Millonkolorimetrie und Bromadditionsverfahren übereinstimmende Werte geben, zur Unterstützung des ersteren dienen.

7. Es ist so als Tyrosingehalt ermittelt worden für das

	Millon-Kolorimetrie Proz.	Bromadditionsverfahren Proz.
Casein	6,8 6,8 6,6	6,8 6,9
Fibrin	4,4 — 4,8	4,9
Hämoglobin	2,8	2,5 2,7
Edestin	4,3 4,3	4,9
Fibroin	10 — 11	9,4 — 10

Schon früher hatten für das (durch seinen Tyrosinreichtum und durch das Fehlen gewisser, die Bestimmungen störender Komponenten ausgezeichnete) Fibroin vier auf grundverschiedenen Prinzipien basierende Methoden übereinstimmende Werte ergeben:

Gravimetrische Bestimmung . . .	10,5 Proz.
Folin-Denis-Bestimmung	11,0 ,,
Bromadditionsbestimmung	11,0 ,,
Diazokolorimetriebestimmung . . .	10,0 ,,

8. Die sich aus dem neuen Verfahren ergebende Möglichkeit der Bestimmung von freiem neben proteingebundenem Tyrosin ist verwertet worden, um an den Beispielen des Caseins und Fibrins die Tyrosinabspaltung durch *Trypsin* bzw. durch *Alkalihydrolyse* zu studieren. Es hat sich stets gezeigt, daß tatsächlich die *Infreiheitsetzung des Tyrosins* der vollkommenen Desintegration des Eiweißmoleklüls, insofern eine solche an dem Freiwerden *formoltitrierbarer Aminogruppen* kenntlich ist, ganz erheblich voraneilt. Es konnte sonach die Annahme bestätigt werden, derzufolge dem Tyrosin sozusagen eine „*periphere*“ *Stellung im Eiweißmolekül* zuerkannt werden soll.

9. Es besteht in dieser Hinsicht ein Gegensatz zum *Tryptophan*, insofern man[1]) keinen Grund hat, diesem letzteren eine besonders *exponierte Stellung* beim Aufbau des Eiweißmoleküls zuzuschreiben. Denn es wird nicht, wie dies beim Tyrosin tatsächlich der Fall ist, bereits in den ersten Phasen des Desintegrationsprozesses seiner Hauptmenge nach in Freiheit gesetzt. Vielmehr schreitet die Abspaltung des Tryptophans nur ganz allmählich und, wie die *Formoltitration nach Sörensen* lehrt, im großen ganzen parallel mit der Abspaltung der Aminosäuren im allgemeinen fort.

---

[1]) *Fürth* und *Lieben*, diese Zeitschr. **109**, 153, 1920.

Zur Kenntnis melanotischer Pigmente.

Von

H. Heinlein.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Universitätsinstituts in Wien.)

(Eingegangen am 12. Oktober 1924.)

I. Einleitung.

Trotz der großen Summe experimenteller Arbeit, die bereits auf die Erforschung der chemischen Beschaffenheit und Zusammensetzung der Melanine verwandt worden ist, rückt die Erkenntnis ihrer chemischen Stellung doch nur sehr langsam vom Fleck, und insbesondere zeigen die Analysen verschiedener Melanine die weitgehendsten Widersprüche (1).

Während bei den von älteren Autoren analysierten Präparaten nicht einmal die restlose Beseitigung anhaftender Eiweißreste gewährleistet erschien, haben zum mindesten *Fürth* und *Jerusalem* (2) diese Fehlerquelle insoweit vermieden, als sie das melaninhaltige Gewebe einige Stunden lang mit konzentrierter HCl zerkochten. Dabei gingen die Gewebe vollständig in Lösung, während die Pigmentkörper ungelöst blieben, durch Filtration abgetrennt und durch Behandlung mit Wasser, verdünnter Natronlauge, Alkohol und Äther in der Wärme ausgiebig gereinigt werden konnten.

Diesem Darstellungsverfahren gegenüber hat jedoch *Salkowski* (3) mit Recht geltend gemacht, daß sich dem Melanin bei der Eiweißhydrolyse auftretende Melanoidinsubstanzen beimengen könnten. Er hatte daher versucht, diesen Übelstand bei der Melanindarstellung in sehr umständlicher Weise durch langdauernde Verdauung mit künstlichem Magensaft sowie durch Behandlung mit Eisessig zu vermeiden.

O. Fürth hat sich nun bemüht, die Verunreinigung des Melanins durch Melanoidinsäuren auf Grund eines *neuen Darstellungsprinzips* zu vermeiden. Dasselbe beruht darauf, daß Melanine in konzentrierter Salzsäure unlöslich sind, wogegen sich Albuminate in einem großen Überschuß von Salzsäure lösen. Wird nun das melaninhaltige Gewebe mit Hilfe von starker Alkalilauge in der Wärme verflüssigt, sodann mit Salzsäure angesäuert, so fällt ein Gemenge von Melanin und Albuminat aus. Wird nun dieser Niederschlag in 10proz. Natronlauge gelöst und das doppelte Volumen konzentrierter Salzsäure hinzugefügt, so geht das Albuminat im Überschuß der Salzsäure wieder in Lösung. Wird nach diesem Prinzip der Vorgang so oft wiederholt, bis im Filtrat

keine Eiweißreste mehr nachweisbar sind, so resultiert schließlich ein Präparat, das sicher frei von Eiweißbeimengungen ist und dem auch sicher keine Melanoidinsäure anhaften kann.

Nach diesem Vorgang hatte bereits früher *Paul Dux* im Laboratorium von *O. Fürth* die Darstellung von Melaninen in Angriff genommen. Da die Arbeit aber aus äußeren Gründen unvollendet geblieben ist, so bin ich gern der Aufforderung von *O. Fürth* nachgekommen, dieselbe fortzusetzen und abzuschließen.

Weiterhin erschien es uns interessant, die so gewonnenen, älteren Präparaten gegenüber durch höheren Grad von Reinheit ausgezeichneten Melanine in bezug auf ihre analytische Zusammensetzung mit einem „*künstlichen*“ *Melanin* zu vergleichen, das aus reinem Tyrosin durch Oxydation mit Kaliumpersulfat nach dem Vorgang von *Eller* und *Koch* (4) dargestellt worden war.

Ferner erschien es uns nicht uninteressant, an der Hand unserer natürlichen Melaninpräparate die Wirkung des „*Diaphanols*“, das ist des Chlordioxyds [*Erich Schmidt* und *Braunsdorf* (5)], das gegenwärtig, wie bekannt, in der Histologie als Aufhellungsmittel eine große Rolle spielt, zu studieren.

Schließlich versuchten wir, über die in der Literatur immer wieder auftauchende Frage des *Reduktionsvermögens von Melaninen* (6, 7) bzw. ihrer ungefärbten Vorstufen, der „Melanogene“ gegenüber ammoniakalischer Silbernitratlösung ins Klare zu kommen.

II. Darstellung und Analysen natürlicher Melanine.

A. Hippomelanin.

1. Darstellung.

Es stand mir ein Präparat zur Verfügung, das von *Paul Dux* in diesem Laboratorium aus melanotischen Pferdelymphdrüsen nach folgendem Vorgang gewonnen worden war:

Das zerkleinerte Gewebe wurde mit der fünffachen Menge Kjeldahllauge einige Stunden am Wasserbade erwärmt, bis völlige Verflüssigung eingetreten war. Sodann wurde mit konzentrierter Salzsäure angesäuert, wobei ein Gemenge von Melanin und Albuminat ausfiel. Dieses wurde abgetrennt, im Soxhlet entfettet, dann in 10proz. Natronlauge gelöst und das doppelte Volumen konzentrierter HCl zugesetzt. Dabei löste sich das Albuminat in Säureüberschuß, das Melanin blieb ungelöst. Dasselbe wurde abgenutscht, wieder mit 10proz. Natronlauge verrieben, wobei eine unechte Lösung erfolgte. Nunmehr wurde wieder durch Zusatz des zweifachen Volumens konzentrierter HCl gefällt und dieser Vorgang so lange wiederholt, bis das Filtrat mit Phosphorwolframsäure keine Fällung mehr gab, also völlig eiweißfrei geworden war. Nunmehr wurde getrocknet, wieder im Soxhlet entfettet. Schließlich wurde das staubfeine, schwarze Pulver in einem geräumigen Kolben längere Zeit mit Wasser am Wasserbade erwärmt, wobei teilweise Lösung erfolgte. Es wurde mit Essigsäure angesäuert, filtriert, mit 1proz. Essigsäure chlorfrei gewaschen, dann mit Alkohol und Äther behandelt und im Vakuum bei 60° getrocknet.

Ich habe das Präparat einer weiteren Reinigung in folgender Weise unterzogen: Es wurde nochmals in 1proz. Natronlauge gelöst, filtriert, das Filtrat mit 10proz. Essigsäure angesäuert, der Niederschlag auf gehärtetem Filter gesammelt, mehrmals mit heißem Wasser gewaschen und schließlich bei 60^0 getrocknet. Die erhaltene Substanz wog etwa 12 g. Wenn ich vom Lösen in Alkali sprach, so muß ich ergänzend bemerken, daß es sich dabei nicht um eine molekulare Lösung handelt, sondern um eine kolloidale, wobei offenbar nur der Dispersitätsgrad in Alkali und Säure verschieden ist, ein Umstand, der eben zur Reinigung dient. Bei längerem Behandeln nimmt jedoch die Löslichkeit in Alkali immer mehr ab, wodurch die Filtration erschwert und mit Verlusten verknüpft ist. So war es auch hier. Gleich nach der ersten Lösung in Natronlauge blieb ein erheblicher Teil auf dem Filter zurück, weshalb ich diesen Teil als zweite Fraktion bezeichnete und, da auch nach erneutem Verreiben mit Natronlauge und Filtrieren ein erheblicher Rückstand blieb, auf Melaninsäure verarbeitete.

2. Analysen.

1. 4,01 mg Substanz ergaben 8,145 mg CO_2 und 1,805 mg H_2O.
2. 4,88 „ „ „ 9,88 „ CO_2 „ 2,26 „ H_2O.
3. 1,1951 g „ verbrauchten 78,39 ccm n/10 H_2SO_4.
4. 1,2112 g „ „ 82,38 „ n/10 H_2SO_4.
5. 10,055 mg „ ergaben 1,01 mg $BaSO_4$.
6. 12,81 „ „ „ 1,365 „ $BaSO_4$.

Gefunden:	C	H	N	S	Asche
	55,40	5,037	9,18	1,38	1,10 Proz.
	55,22	5,18	9,39	1,46	1,20 „

Mittelwert aschefrei:		Relation auf N berechnet:	
C	55,92 Proz.	C	6,96 Proz.
H	5,17 „	H	7,66 „
N	9,38 „	N	1,00 „
S	1,44 „	S	0,07 „
O	28,09 „	O	2,62 „
	100,00 Proz.		

B. Hippomelaninsäure.

1. Darstellung.

Der weiter oben erwähnte Rückstand, der grob getrocknet etwa 25 g wog, wurde mit 150 g Ätzkali im Nickeltiegel 1 Stunde lang auf dem Ölbade bei etwa 210^0 geschmolzen. Der nach dem Abkühlen entstandene harte Kuchen wurde in Wasser gelöst, was sehr leicht gelang, und dann mit 80proz. Essigsäure gefällt. Nach Absaugen wurde der Rückstand mit heißem Wasser und Alkohol gut ausgewaschen und im Vakuum bei 60^0 getrocknet. Das Gewicht betrug 2,436 g.

2. Analysen.

1. 3,94 mg Substanz ergaben 7,00 mg CO_2 und 1,405 mg H_2O.
2. 3,755 „ „ „ 6,64 „ CO_2 „ 1,36 „ H_2O.
3. 3,41 „ „ verbrauchten 3,21 ccm H_2SO_4.
4. 4,25 „ „ „ 4,05 „ H_2SO_4.
   (1 ccm H_2SO_4 = 0,0663 mg N.)
5. 8,435 mg Substanz ergaben 0,55 mg $BaSO_4$.
6. 22,41 „ „ „ 1,515 „ $BaSO_4$.

Gefunden:	C	H	N	S	Asche
	48,45	3,99	6,24	0,89	8,4 Proz.
	48,23	4,05	6,32	0,99	9,1 „

Mittelwert aschefrei:

C	52,97 Proz.
H	4,41 „
N	6,83 „
S	1,01 „
O	34,78 „
	100,00 Proz.

Relation auf N = 1 berechnet:

C	9,00
H	8,97
N	1,00
S	0,06
O	4,46

C. Sarkomelanin.

1. Darstellung.

Zur Herstellung von „Sarkomelanin" wurde in Alkohol aufbewahrte, von Melanosarkomknoten reichlich durchsetzte Leber zerschnitten und in der Fleischhackmaschine zerkleinert. Hierauf wurde koliert und in dünner Schicht auf Glasplatten bei etwa 70° getrocknet, im Mörser pulverisiert und im Soxhlet entfettet. Nach Verdunstung des Äthers wurde mit fünffacher Menge Kjeldahllauge am Wasserbade bis zur Verflüssigung erwärmt und dann mit konzentrierter HCl angesäuert, wobei ein Gemenge von Melanin und Albuminat ausfiel. Es wurde abgesaugt, wobei ein Teil des Albuminats ins Filtrat ging, Melanin aber zurückblieb. Nun wurde der Rückstand in 10proz. Natronlauge gelöst und das doppelte Volumen konzentrierter HCl hinzugesetzt, wobei wieder ein Gemenge von Melanin und Albuminat ausfiel. Dieser Vorgang wurde noch mehrmals wiederholt, wodurch das Eiweiß immer mehr beseitigt wurde. Nach der sechsten Wiederholung war Phosphorwolframsäurefällung nur noch schwach, die Probe von *Voisenet* ebenfalls schwach positiv. Da jetzt die Gefahr einer Melanoidinbildung nicht mehr groß war, wurde, um das Eiweiß noch vollständig zu beseitigen, nach Lösen in Natronlauge und Versetzen mit dem doppelten Volumen konzentrierter HCl mehrere Stunden auf dem Wasserbade erwärmt. Im Filtrat war Phosphorwolframsäurefällung noch angedeutet, *Voisenet* schwach positiv. Der Rückstand wurde nochmals mit 500 ccm konzentrierter HCl versetzt und im Kolben mit Steigrohr 4 Stunden auf dem Wasserbade erhitzt. Im Filtrat Phosphorwolframsäurefällung negativ, *Voisenet* angedeutet. Das Präparat konnte somit

als eiweißfrei betrachtet werden und wurde nun in einer Emailschale mit reichlich Wasser auf dem Wasserbade erwärmt, um die anorganischen Salze (NaCl) zu entfernen. Nach längerem Erwärmen wurde abgesaugt, mit heißem Wasser nachgewaschen, wieder auf dem Wasserbade erwärmt und dieser Vorgang so lange wiederholt, bis die Chlorprobe negativ ausfiel. Dann wurde das Präparat 8 Tage lang in Alkohol aufbewahrt, hierauf mit Alkohol auf dem Wasserbade erwärmt und nun noch mehrere Tage in einem Alkohol-Äthergemisch stehengelassen.

Schließlich wurde abgesaugt, im Vakuum bei 60° getrocknet, im Mörser zerrieben und gewogen. Gewicht 4,26 g.

2. Analysen.

1. 4,015 mg Substanz ergaben 8,14 mg CO_2 und 1,99 mg H_2O.
2. 3,94 „ „ „ 7,97 „ CO_2 „ 1,96 „ H_2O.
3. 0,4470 g „ verbrauchten 25,9 ccm n/10 H_2SO_4.
4. 0,5762 g „ „ 34,7 „ n/10 H_2SO_4.
5. 10,32 mg „ ergaben 1,745 mg $BaSO_4$.
6. 10,63 „ „ „ 1,685 „ $BaSO_4$.

Gefunden:	C	H	N	S	Asche
	55,29	5,546	8,11	2,32	1,64 Proz.
	55,17	5,567	8,43	2,18	2,16 „

Mittelwert aschefrei:		Relation auf N = 1 berechnet:	
C	56,28 Proz.	C	7,61
H	5,68 „	H	9,35
D	8,44 „	N	1,00
S	2,29 „	S	0,12
O	27,31 „	O	2,83
	100,00 Proz.		

III. Darstellung und Analyse eines „künstlichen“ Melanins.

1. Darstellung.

Eller und *Koch* (4) haben aus Brenzcatechin, Hydrochinon und Phenol, durch Oxydation mit Kaliumpersulfat in alkalischer Lösung und Fällung mit HCl, dunkelgefärbte, amorphe, schwer lösliche Produkte („Huminsäuren“) dargestellt und genauer studiert. Ihrem Vorgang folgend, suchten wir ein analoges Präparat aus Tyrosin herzustellen.

Es wurden 5 g Tyrosin (*Merck*) mit 250 ccm 1proz. Natronlauge versetzt und auf dem Wasserbade in Lösung gebracht, wobei ein bräunlichgelber Farbton auftrat. Nach dem Abkühlen wurden portionsweise innerhalb einer Stunde 25 g Kaliumpersulfat dazugegeben. Die Farbe ging dabei ins Rotbraune über. Da die Lösung nicht ganz klar war, wurde noch mehr Natronlauge hinzugefügt, wodurch die Lösung

vollständig wurde. Hierauf wurde durch ein Faltenfilter filtriert, um Unreinlichkeiten abzutrennen und das Filtrat so lange mit 5proz. HCl versetzt, bis die überstehende Flüssigkeit klar war. Der entstehende massige Niederschlag wurde auf gehärtetem Filter gesammelt. Das Filtrat hiervon wurde nochmals mit 5proz. HCl versetzt, wobei wieder eine Fällung entstand. Die beiden Niederschläge wurden mit Wasser verrieben, abgesaugt, kräftig nachgewaschen und diese Prozedur so lange wiederholt, bis die Chlorprobe negativ ausfiel. Dann wurde im Vakuum 24 Stunden bei 60° getrocknet. *Gewicht* 1,4685 g.

2. Analyse.

1. 4,69 mg Substanz ergaben 9,00 mg CO_2 und 1,43 mg H_2O.
2. 5,18 „ „ „ 9,47 „ CO_2 „ 2,01 „ H_2O.
3. 3,66 „ „ verbrauchten 2,58 ccm H_2SO_4.
4. 3,395 „ „ 2,44 „ H_2SO_4.

(1 ccm H_2SO_4 = 0,0663 mg N.)

Gefunden:	C	H	N	Asche
	52,34	4,37	4,67	0,67 Proz.
	52,48	4,34	4,76	0,34 „

Mittelwert aschefrei:

C	52,67 Proz.
H	4,38 „
N	4,75 „
O	38,20 „
	100,00 Proz.

Relation auf N = 1 berechnet:

C	12,90
H	12,80
N	1,00
O	7,00

IV. Übersicht der Versuchsresultate.

Überblicken wir nunmehr die Resultate der Analysen und vergleichen wir dieselben mit einigen der wichtigsten älteren Analysenresultate:

1. Natürliche Melanine.

	Hippomelanin	Sarkomelanin	Hippomelaninsäure
C	55,92	56,28	52,97
H	5,17	5,68	4,41
N	9,38	8,44	6,83
S	1,44	2,29	1,01
O	28,09	27,31	34,78
	100,00	100,00	100,00

Relation:

Hippomelanin	Sarkomelanin	Hippomelaninsäure
C . . . 6,96	C . . . 7,61	C . . . 9,00
H . . . 7,66	H . . . 9,35	H . . . 8,97
N . . . 1,00	N . . . 1,00	N . . . 1,00
O . . . 2,62	O . . . 2,83	O . . . 4,46

	Hippomelanin (*Berdez-Nenki*) (8)	Hippomelanin (*Rona-Riesser*) (9)	Sarkomelanin (*Salkowski*)
C	54,60	55,56	54,92
H	3,87	3,68	5,21
N	10,67	9,90	11,03
S	2,84	—	3,42
O	28,02	30,86	25,42
	100,00	100,00	100,00

Relation:

C . . . 5,97	C . . . 6,55	C . . . 5,81
H . . . 5,04	H . . . 5,17	H . . . 6,56
N . . . 1,00	O . . . 2,73	N . . . 1,00
O . . . 2,30		O . . . 2,02

2. Künstliche Melanine aus Tyrosin.

	Heinlein (Kaliumpersulfat)	*Fürth-Jerusalem* (Pilztyrosinase)	*Ducceschi* (10) (chlors. Kali)	Tyrosin
C	52,67	52,77	52,19	59,67
H	4,38	4,16	4,75	6,07
N	4,75	7,62	6,43	7,73
O	38,20	35,45	36,63	26,53
	100,00	100,00	100,00	100,00

Relation:

C . . . 12,9	C . . . 8,2	C . . 9,4	C . . . 9
H . . . 12,8	H . . . 7,7	H . . 10,3	H . . . 11
N . . . 1,0	N . . . 1,0	N . . 1,0	N . . . 1
O . . . 7,0	O . . . 4,1	O . . 4,98	O . . . 3

Es ergibt sich zunächst als bemerkenswerte Tatsache, daß die Werte der beiden von uns analysierten natürlichen Melanine, trotzdem es sich um durchaus verschiedenes Ausgangsmaterial gehandelt hat (melanotische Pferdelymphdrüsen einerseits — Melanosarkommetastasen der menschlichen Leber andererseits), leidlich miteinander übereinstimmen. Der Stickstoffgehalt derselben beträgt rund 9 Proz. und ist wesentlich niedriger als derjenige der bisher analysierten Präparate. Die Durchsicht einer von *O. Fürth* zusammengestellten Tabelle (11) ergibt für 23 Präparate bei der überwiegenden Mehrzahl derselben Werte von 10 bis 14 Proz. N. Nur drei davon zeigen Werte von 8 bis 9 Proz.

Wir haben also Grund anzunehmen, daß wir bei unseren Reinigungsprozeduren weiter gekommen sind als unsere Vorgänger und daß es uns tatsächlich gelungen ist, die analysenfälschenden Beimengungen zu beseitigen.

Weiter ergibt sich die Tatsache, daß bei der Einwirkung der Kalischmelze eine Verarmung der Präparate an N (vermutlich infolge einer Abspaltung desselben in Form von Ammoniak) Platz greift.

Vergleichen wir die Relation zwischen C, H, N und O mit derjenigen des Tyrosins:

Natürliche Melanine:		Tyrosin:	
N	1,0	N	1,00
C	7,0—7,5	C	9,00
H	7,5—9,5	H	11,00
O	2,6—2,8	O	3,00

so ergibt sich, anknüpfend an die Hypothese, daß das Tyrosin die Muttersubstanz der Melanine sei, daß es sich im wesentlichen um *Abspaltung von 1 oder 2 Kohlenstoffatomen und Wegoxydation von einigen Wasserstoffatomen ohne wesentliche Anreicherung des Oxydationsproduktes an O handelt.* Es steht dies durchaus im Einklang mit Untersuchungen von *Bach* (12) und *Chodat* (13) einerseits, *H. Przibram* (14) andererseits, die es wahrscheinlich machen, daß die oxydative Melaninbildung sich unter Abspaltung von Kohlensäure vollzieht. *Bach* vermutet, daß Kohlensäureabspaltung aus dem Tyrosin als erste Stufe der Melaninbildung zu bezeichnen sei[1]).

Es ist klar zu ersehen, daß die Versuche, den Vorgang der natürlichen Melaninbildung durch Einwirkung starker Oxydationsmittel nachzuahmen [chlorsaures Kali: *Ducceschi* (10) — Kaliumpersulfat: *Heinlein*], wenig Aussicht auf Erfolg haben, da dabei sicherlich ein Teil des Tyrosin-N vermutlich in Form von NH_3 abgespalten wird.

Was endlich den S-Gehalt der Melanine betrifft, so sind die von uns gefundenen Zahlen immerhin geringer als diejenigen der Mehrzahl der bisher analysierten Melanine.

Es liegen Analysen vor, die mehr als 10 Proz. dieses Bestandteils enthalten, andererseits sind wiederum viele Melanine gänzlich schwefelfrei gefunden worden. Auch vermochten *Fürth* und *Jerusalem* durch eingreifende Behandlung von Hippomelanin mit schmelzendem Kali und mit anderen Oxydationsmitteln den S-Gehalt auf einen Bruchteil des ursprünglichen Wertes herabzudrücken. Wir halten daher den Schwefel für keinen *wesentlichen* Bestandteil der Melanine. Dagegen wäre es immerhin denkbar, daß das an sich schwefelfreie Melanin oder eine Vorstufe desselben mit reaktionsfähigen schwefelhaltigen Gruppen eine *chemische* Verbindung, vielleicht aber auch nur eine *physikalische* Adsorptionsverbindung eingehen können.

V. Reduktionsvermögen von Melaninen.

In der neueren Literatur ist vielfach von leichtoxydablen Präpigmenten der Melanine die Rede. So betont *Lignac* (6), daß dem normalen menschlichen Hauptpigmentierungsvorgang ein Präpigment vorangehe (Dioxybenzolderivate ?), das lichtempfindlich, leicht oxydabel

[1]) Dabei würde aus Tyrosin das Oxyphenyläthylamin entstehen, welches tatsächlich durch seine leichte Angreifbarkeit ausgezeichnet ist. *Neuberg* (15) fand einmal ein Melaninferment, das Tyrosin nicht anzugreifen vermochte, dieser Base gegenüber wirksam.

und befähigt sei, eine Silbernitratlösung zu reduzieren. Vgl. diesbezüglich auch *Kutschera-Aichberger* (16)! *Lignac* nimmt jedoch an, daß nicht nur die farblosen Vorstufen, sondern auch gefärbte Derivate imstande sind, ammoniakalische Silbernitratlösung zu reduzieren.

Ich versuchte diese Frage zu klären. Dabei bin ich so vorgegangen, daß ich zu einer abgewogenen Menge Substanz, die ich in Ammoniak löste, eine titrierte Menge n/10 $AgNO_3$-Lösung hinzugab und erwärmte; dann wurde mit konzentrierter H_2SO_4 bis zu gut lackmussaurer Reaktion versetzt, die ganze Menge gemessen, filtriert und in einer abgemessenen Menge Filtrat das Silbernitrat mit Ammoniumrhodanid zurücktitriert. Die Differenz ergab das gebundene Silber. Es war aber durchaus nicht ohne weiteres klar, ob das etwa fehlende Silber wirklich reduziert worden war, ob es nicht vielleicht kolloidal an das Melanin gebunden war. Ein derartiger Vorgang sollte durch Erwärmen mit konzentrierter H_2SO_4 vermieden werden. Weiterhin war es möglich, daß das Silber mit dem Schwefel des Melanins eine Verbindung einging. Diese ganzen Überlegungen erweisen sich jedoch als überflüssig, wenn man das Resultat betrachtet. In fast allen Fällen konnte ich nahezu das gesamte Silbernitrat zurücktitrieren. Ein Beispiel aus dem Protokoll möge dies erläutern.

0,546 g Hippomelanin, gelöst in Ammoniak, 10 ccm n/10 $AgNO_3$ hinzugesetzt und erwärmt. Nach dem Erkalten mit konzentrierter H_2SO_4 versetzt, nochmals erhitzt, filtriert. Titration mit n/10 Ammoniumrhodanid ergibt:

$$9{,}1 \text{ ccm n/10 } AgNO_3 \,.\, 1{,}05 \text{ (Faktor)} + \mathit{9{,}55} \text{ ccm.}$$

Die Differenz von 0,45 muß als im Bereich der Fehlergrenze angesehen werden.

Ich bin mir durchaus bewußt, daß an diese Untersuchungen nicht der kritische Maßstab exakter chemischer Methoden angelegt werden darf; denn es sind mancherlei Fehlerquellen vorhanden, so vor allem die starke Färbung des Filtrats, die die Feststellung des Farbumschlags oft sehr erschwert. Selbstverständlich wurde vorher jedes Präparat auf Chlorfreiheit untersucht und eventuell der Chlorgehalt bestimmt.

Einen gegenteiligen exakten Beweis für das Reduktionsvermögen der Melanine konnte ich in der Literatur nicht finden. *Lignac* (5) verweist auf *Schneider* und *Schreiber* (7), die Pigmente durch Einlegen von Gewebsschnitten in Silbernitratlösung zum Vorschein bringen, so daß er anscheinend diesen Umstand als beweisend ansieht. Dieser Schluß erscheint gewagt, denn es ist zum mindesten sehr unwahrscheinlich, daß das Melanin als Endprodukt eines Oxydationsvorgangs noch Reduktionswirkungen ausübt.

Etwas anderes wäre es mit der Annahme einer farblosen *Vorstufe*, des „Melanogens“, das $AgNO_3$ reduzieren und sich dabei selbst weiter

zu gefärbtem Melanin oxydieren könnte. Dies wäre sehr gut denkbar; kennen wir doch den allmählichen Übergang von farblosen Vorstufen über farbige in das dunkle Melanin bei der Darstellung künstlicher Melanine.

Bei allen derartigen Überlegungen kann allerdings der Einwand nicht von der Hand gewiesen werden, daß das aus seinem Zusammenhang gerissene und gereinigte Melanin sich nicht völlig in seinem Verhalten mit dem in den Geweben vorkommenden natürlichen decke. So war es *O. Fürth* schon früher aufgefallen, daß es erst bei außerordentlich intensiver Einwirkung gelingt, chemisch gereinigtes Melanin durch H_2O_2 zu entfärben, während es dagegen bekanntlich ziemlich leicht ist, Haare derart zu bleichen, daß dieselben nunmehr blond erscheinen.

In diesem Zusammenhang dürften auch einige Beobachtungen, die ich gelegentlich über die Einwirkung von *„Diaphanol“* *(ClO_2)* auf Melanin machte, von Interesse sein.

Erich Schmidt und *Braunsdorf* (5) sagen diesbezüglich: „Wie die Aminosäuren Tyrosin, Dioxyphenylanalin, Tryptophan, so werden auch ihre farbigen Umwandlungsprodukte von ClO_2 angegriffen. Pigmentierte, undurchsichtige Gewebe werden daher nach Behandlung mit ClO_2, das zweckmäßigerweise in essigsaurer Lösung angewendet wird, in überraschender Weise aufgehellt und der mikroskopischen Beobachtung zugänglich gemacht, ohne daß die Strukturen der Gewebe auch nur im mindesten verändert werden.“

Ich habe bei der Einwirkung von „Diaphanol“ auf verschiedene isolierte Melanine und Melaninsäuren bestenfalls einen Übergang der Farbe von Schwarz in Rotbraun beobachtet, dagegen nie eine vollständige Entfärbung, selbst nicht nach wochenlangem Stehen und auch nicht nach Kochen mit „Diaphanol“. Dieses Verhalten steht also im strikten Gegensatz zu den Erfahrungen der Histologen. Es wäre vielleicht auch denkbar, daß die Einwirkung des „Diaphanols“ auf Gewebsschnitte infolge der feineren Verteilung des Melanins leichter möglich ist, doch gelingt es auch leicht, größere Objekte, wie die Flügeldecken eines großen Wasserkäfers, mit Diaphanol völlig zu entfärben.

VI. Zusammenfassung.

1. Die große Schwierigkeit, natürliche Melanine von fest anhaftenden Eiweißbeimengungen oder Eiweißderivaten zu befreien, kann durch Kochen derselben mit rauchender HCl nicht umgangen werden, da sich in diesem Falle der Spaltung des Tryptophankomplexes im Eiweißmolekül entstammende Melanoidinsäuren den Melaninen beimengen. Es ist daher ein neues Prinzip der Melanindarstellung zur Anwendung gelangt. Dasselbe beruht darauf, daß die melaninhaltigen Gewebe durch Alkali in der Wärme desintegriert werden. Durch Ansäuern mit HCl wird ein Gemenge von Melanin und Albuminat gefällt. Wird

nun dieses Gemenge in Natronlauge gelöst und mit dem doppelten Volumen konzentrierter HCl versetzt, so fällt das Melanin aus, während das Albuminat im Säureüberschuß gelöst bleibt. Wird dieser Vorgang so oft wiederholt, bis Phosphorwolframsäure im Filtrat keine Fällung mehr gibt, so erscheint die restlose Beseitigung von Eiweißbeimengungen durchaus gewährleistet.

2. Die so einerseits aus melanotischen Pferdelymphdrüsen, andererseits aus Melanosarkommetastasen menschlicher Lebern gewonnenen Melanine zeigten in ihrer analytischen Zusammensetzung (C 55,9 bis 56,3 Proz., H 5,2 bis 5,7 Proz., N 8,5 bis 9,4 Proz., O 27,3 bis 28,1 Proz.) ziemliche Übereinstimmung.

3. Der Vergleich derselben mit der Zusammensetzung des Tyrosins einerseits, mit künstlichem, durch Einwirkung von Pilztyrosinase auf Tyrosin entstandenem Melanin andererseits, spricht nicht gegen die Annahme, daß das Tyrosin im wesentlichen die Muttersubstanz der Melanine sei und daß der Übergang von Tyrosin in Melanin im wesentlichen durch Abspaltung von 1 oder 2 C-Atomen, sowie durch oxydative Beseitigung eines oder mehrerer H-Atome eingeleitet werde.

4. Der Versuch, durch Einwirkung von Kaliumpersulfat oder anderen kräftigen Oxydationsmitteln auf Tyrosin den Vorgang der natürlichen Melaninbildung nachzuahmen, erscheint wenig aussichtsreich, insofern dabei eine Abspaltung von N sich vollzieht.

5. Die Angabe, daß nicht nur Präpigmente, sondern auch fertige Melanine befähigt seien, ammoniakalische Silbernitratlösung zu reduzieren, konnte nicht bestätigt werden.

6. Auf chemischem Wege gereinigte Melanine unterscheiden sich von dem in den Geweben präformierten Melanin durch den Umstand, daß eine Entfärbung durch „Diaphanol“ (ClO_2) nicht gelingt.

Literatur.

1) *Fürth*, Zentralbl. f. allg. Pathol. u. Oppenheimers Handb. d. Biochem. 1924. — 2) *Fürth* und *Jerusalem*, Hofmeisters Beitr. **10**, 1907. — 3) *Salkowski*, Virchows Arch. f. Pathol. 1920, S. 227. — 4) *Eller* und *Koch*, Ber. d. chem. Ges. **53**, 1469, 1920. — 5) *Schmidt* und *Braunsdorf*, Berl. Ber. **55**, 6. — 6) *Lignac*, Virchows Arch. f. Pathol. 1923, S. 240. — 7) *Schreiber* und *Schneider*, Münch. med. Wochenschr. 1908, S. 1918. — 8) *Berdez* und *Nenski*, Arch. f. exper. Pathol. **20**, 346. — 9) *Rona* und *Riesser*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **57**, 61. — 10) *Ducceschi*, Rend. della R. Acad. dei Lincei **10**, 1, 1901. — 11) *Fürth*, Zentralbl. f. allg. Pathol. **15**, 1904. — 12) *Bach*, diese Zeitschr. **60**, 1914. — 13) *Chodat*, ebendaselbst **57**, 1913. — 14) *H. Przibram*, Arch. f. Entwickl.-Mechan. **43** bis **48**, 1917 bis 1921. — 15) *Neuberg*, diese Zeitschr. 8, 1908. — 16) *Kutschera-Aichberger*, Frankfurter Zeitschr. f. Pathol. **27**, 1922.

Über die Stickstoffverteilung in der Oxyproteinsäurefraktion des Harns.

Von

Ludwig Brings.

(Aus der chemischen Abteilung des Wiener physiologischen Universitätsinstituts.)

(Eingegangen am 12. Oktober 1924.)

I.

Die seinerzeit von *Gottlieb* und *Bondzynski* entdeckten und von ihnen als „Oxyproteinsäuren" bezeichneten Substanzen von saurem Charakter werden allgemein als stickstoff- und schwefelhaltige, anscheinend hochmolekulare Eiweißoxydationsprodukte aufgefaßt. Der chemische Aufbau derselben liegt aber noch ganz im Dunkeln. Sie sind früher meist als den Polypeptiden nahestehende Produkte aufgefaßt worden. Im Gegensatz zu dieser Auffassung stehen jedoch neue Angaben von *Edelbacher* einerseits, von *E. Freund* und *Anna Sittenberger* andererseits, welche darauf hinzudeuten scheinen, daß zum mindesten ein Teil derselben nicht den Polypeptiden, vielmehr dem Harnstoff nahestehe. Angesichts der völligen Ungeklärtheit des ganzen Problems bin ich auf Anregung von Prof. *O. Fürth* darangegangen, die Stickstoffverteilung innerhalb der Oxyproteinsäurefraktion des Harns einer vielseitigeren Untersuchung zu unterziehen, als dies bisher geschehen war.

Die Stickstoffverteilung innerhalb der Oxyproteinsäurefraktion des Menschenharns ist seinerzeit von *Browinsky* und *Dombrowski*[1]) untersucht worden (und zwar gesondert für die Alloxy-, Antoxy- und Oxyproteinsäure) einerseits nach neunstündigem Kochen mit etwa 18proz. Salzsäure, andererseits nach 24stündigem Erwärmen mit 20proz. Fluorwasserstoffsäure. In letzterem Falle entfielen vom Gesamt-N auf die:

	Alloxyproteinsäure	Antoxyproteinsäure	Oxyproteinsäure
Ammoniakfraktion	4,2	3,2	8,3
Formoltitrierbarer Amino-N . .	76,9	33,9	80,5

„Beim Kochen mit Salzsäure", heißt es, „werden große Mengen von Ammoniak gebildet (12 bis 25 Proz. des Gesamt-N), wahrscheinlich infolge der sekundären Wirkung dieses hydrolytischen Agens auf die frei werdenden Aminosäuren; daneben finden Oxydations- und Kondensationserscheinungen

[1]) *S. Browinsky* und *St. Dombrowski*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 77, 102 und 104, 1912.

statt, was die Bildung von melanoiden Substanzen aus allen Oxyproteinsäuren beweist. Die Hydrolyse mit Fluorwasserstoffsäure verläuft bei niederer Temperatur tiefer unter Bildung von größeren Mengen von Spaltungsprodukten und darunter bedeutend geringerer Mengen von Ammoniak, als die Hydrolyse mit Salzsäure."

Bei Fortsetzung dieser Untersuchungen gelangte *Glagolew*[1]) zu der Anschauung, daß die Oxyproteinsäuren polypeptidartige Stoffe darstellen, da die Menge der darin enthaltenen Aminogruppen bei der Hydrolyse anwächst. Bei der Bestimmung nach *van Slyke* fand sich in der Oxyproteinsäure 44,3 Proz. des Gesamt-N als Amino-N; die Hauptmenge der bei hydrolytischer Spaltung der Oxy- und Alloxyproteinsäuren auftretenden N-haltigen Produkte erwies sich durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar.

R. Sassa[2]) hat bei seinen (in diesem Laboratorium ausgeführten) Untersuchungen festgestellt, daß die nach seinem Verfahren gewonnene sogenannte „Barytfraktion" keine in Betracht kommenden Mengen von freiem Harnstoff, freiem Ammoniak oder freien Aminosäuren enthält. 70 bis 80 Proz. fanden sich in der durch Quecksilberacetat bei alkalischer Reaktion fällbaren Fraktion (Oxyproteinsäure-N) wieder. 9 bis 10 Proz. des Baryt-N waren direkt durch Phosphorwolframsäure bei neutraler Reaktion fällbar. Der Polypeptid-N, d. h. der durch Säure und Alkaliwirkung hydrolysierbare Anteil des Baryt-N schwankte zwischen 24 bis 34 Proz. Als Polypeptid-N wurde jener N bezeichnet, der sich aus der hydrolysierten Barytfraktion bei der Bestimmung nach *van Slyke* innerhalb 10 Minuten entwickelt hatte. Die Säurehydrolyse (dreistündiges Kochen der Barytfraktion mit 20proz. Salzsäure) und die Alkalihydrolyse (vierstündiges Kochen mit gesättigter Barytlösung unter 4 Atmosphären Druck) erwiesen sich in ihren Leistungen als gleichwertig.

Angesichts der Befunde *Sassas* mußte eine Angabe *Edelbachers*[3]) höchst auffallend erscheinen; derselbe hatte im Heidelberger physiologischen Institut 300 Liter Harn nach den Angaben von *Bondzynski* und *Gottlieb* verarbeitet. Bei der Überführung des oxyproteinsauren Baryts in das Quecksilbersalz und dieses letzteren in die freie Säure ist nun angeblich Zersetzung erfolgt und konnte fast sämtlicher N der Oxyproteinsäuren in Form von Harnstoff isoliert werden.

Anknüpfend an diesen Befund haben nun *Ernst Freund* und *Anna Sittenberger-Kraft*[4]) ihrerseits mitgeteilt, eine von ihnen dargestellte Oxyproteinsäure habe bei Zersetzung mit verdünnter Schwefelsäure einerseits eine organische N-haltige Säure, andererseits aber Harnstoff geliefert. (Der Nachweis desselben erscheint aber allerdings keineswegs eindeutig.) Dieses Resultat steht im Widerspruch zu den Angaben, die über die Oxyproteinsäuren bei deren Entdeckung durch *Bondzynski* und *Gottlieb* gemacht worden sind, deckt sich aber mit der mittlerweile gemachten Beobachtung von *Edelbacher*, daß sich bei der Zersetzung der Substanz Harnstoff bildet. Das Ergebnis der Spaltungsversuche läßt annehmen, daß die Substanz nicht den Eiweißkörpern, vielmehr dem Harnstoff nahesteht.

Inzwischen hat aber *Edelbacher*[5]) seine erste Mitteilung ergänzt und in folgendem Sinne richtiggestellt: Die Antoxyproteinsäure (die mit

[1]) *P. Glagolew*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **89**, 432, 1914.
[2]) *R. Sassa*, diese Zeitschr. **64**, 208, 1914.
[3]) *S. Edelbacher*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **120**, 71, 1922.
[4]) *E. Freund* und *A. Sittenberger-Kraft*, diese Zeitschr. **136**, 145, 1923.
[5]) *S. Edelbacher*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **127**, 186, 1923.

Quecksilberacetat bei saurer Reaktion fällbaren Säuren umfassend) besteht aus polypeptidartigen Körpern, die verhältnismäßig viel Monoaminosäuren, aber auch Arginin, Histidin und Lysin enthalten. Sie ist anscheinend grundverschieden von den „Oxyproteinsäuren", die angeblich nur Spuren von Monoaminosäuren enthält und hauptsächlich aus Harnstoff besteht.

Die Hydrolyse derselben ergab:

Humin-N	20 Proz.		
NH_3-N	28,9 „		
Phosphorwolframsäure-N	13,3 „	Histidin-N	6,6 Proz.
		Arginin-N	3,1 „
Monoamino-N	37,1 „	Lysin-N	3,1 „
	100,0 Proz.		

II.

O. v. Fürth[1]) hat nun seinerzeit ein vereinfachtes Verfahren zur Bestimmung der Oxyproteinsäurefraktion im Harn angegeben. Dasselbe beruht auf der Überlegung, daß es von großem Vorteil sein muß, vor Abtrennung der Oxyproteinsäuren von vornherein den Harnstoff zu beseitigen; denn die großen Harnstoffmassen sind es eben in erster Linie, welche die scharfe Abtrennung und Reinigung der Oxyproteinsäurefraktion außerordentlich erschweren. Dieser Zweck wird durch Vergärung des gesamten im Harn enthaltenen Harnstoffs mit *Soja-Urease* erreicht. Das entstandene Ammoniumcarbonat wird in Ammonsulfat übergeführt, dieses größtenteils mit saurem Alkohol, der Rest durch Ätzbaryt in der Wärme, der Barytüberschuß durch Kohlensäure beseitigt, das Filtrat mit Kieselgur zur Trockne gebracht. Sodann werden alle alkohollöslichen Substanzen durch Auskochen mit Alkohol beseitigt. So erhält man schließlich die Fraktion der alkoholunlöslichen, wasserlöslichen Barytsalze der Harnbestandteile von saurem Charakter („Barytfraktion"). Der darin durch Mercuriacetat bei sodaalkalischer Reaktion fällbare N gibt den Oxyproteinsäure-N, der im normalen Harn ein Mittel von etwa 3 Proz. des Gesamt-N ausmacht.

Da bei diesem Vorgang eine Verunreinigung der Barytfraktion durch beigemengte Harnstoffreste von vornherein ausgeschlossen ist (ein etwa der Vergärung entgangener Harnstoffrest mußte sicherlich durch das mehrstündige Auskochen mit Alkohol beseitigt worden sein), erscheint dieser Vorgang zur Entscheidung der Frage geeignet, ob tatsächlich die Baryt- bzw. die darin enthaltene Oxyproteinsäurefraktion bei der Aufspaltung ansehnliche Mengen von Harnstoff zu liefern vermag oder wenn nicht solchen, so doch ihm nahestehende Komplexe, welche, ebenso wie der Harnstoff, bei eingreifender Hydrolyse ihren N in Form von Ammoniak abgeben müßten. Man durfte also

[1]) *O. von Fürth*, diese Zeitschr. **69**, 448, 1915.

hoffen, auf diesem Wege die Frage entscheiden zu können, ob tatsächlich die Oxyproteinsäurefraktion aus polypeptidartigen Komplexen bestehe, die dann bei der Hydrolyse, sei es Monoamino-N, sei es Diamino-N, sei es endlich in zyklischen Komplexen eingeschlossenen N, jedenfalls aber festgebundenen N liefern müßten, oder ob dabei viel „lockerer N" vorhanden sei, der durch Hydrolyse (sei es bei alkalischer, sei es bei saurer Reaktion) als Ammoniak in Erscheinung tritt.

Wir haben nun derartige hydrolytische Eingriffe in verschiedener Art vorgenommen: a) einfache Destillation mit Barytwasser; b) Destillation unter Zusatz von Ätzbaryt in Substanz (wobei angesichts der größeren Löslichkeit des Ätzbaryts in heißem Wasser OH-Ionen in höherer Konzentration in Aktion treten); c) das Harnstoffbestimmungsverfahren nach *Folin* (wobei bekanntlich in einem Gemisch von kristallisiertem Magnesiumchlorid und konzentrierter Salzsäure Temperaturen bis 150 bis 155° erreicht werden); d) 16stündige Hydrolyse mit 25proz. H_2SO_4; e) Kombination dieser letzteren mit dem Folinverfahren.

Versuch A.

Vorversuch mit dem Reste einer jahrelang unter Chloroformzusatz aufbewahrten Barytfraktion, die seinerzeit im Laboratorium bei der Verarbeitung von 100 Litern normalen Menschenharns dargestellt werden war.

Der Gesamt-N betrug $\left.\begin{matrix}0,308\\0,308\end{matrix}\right\}$ 0,308 g in 100 ccm = 100 Proz. des Gesamt-N.

Die Fraktion hatte bei der langdauernden Aufbewahrung ihr Verhalten geändert insofern, als nur $\left.\begin{matrix}0,077\\0,077\end{matrix}\right\}$ 0,077 Proz. (also nur 25 Proz.) davon, der Definition der Oxyproteinsäurefraktion entsprechend, sich durch Quecksilberacetat fällbar erwies.

Durch Destillation mit Magnesium wurde daraus $\left.\begin{matrix}0,0364\\0,0336\end{matrix}\right\}$ 0,0350 Proz. = 11,3 Proz. des Gesamt-N direkt in Freiheit gesetzt.

Die Harnstoffbestimmung nach *Folin* ergab $\left.\begin{matrix}0,044\\0,043\end{matrix}\right\}$ 0,0435 g in 100 ccm = 14,1 Proz. des Gesamt-N.

Die Harnstoffbestimmung nach *Mörner Sjöquist* (Gesamt-N der alkoholätherlöslichen Fraktion) ergab 0,0679 = 21,8 Proz. des Gesamt-N.

Bei der einfachen Destillation mit Barytwasser wurde in Freiheit gesetzt $\left.\begin{matrix}0,042\\0,042\end{matrix}\right\}$ 0,042 g in 100 ccm = 13,6 Proz. des Gesamt-N.

Genau dieselbe Ammoniakmenge ergab sich bei Destillation mit Ätzbaryt in Substanz $\left.\begin{matrix}0,042\\0,042\end{matrix}\right\}$ 0,042 g in 100 ccm = 13,6 Proz. des Gesamt-N.

Ein Anteil der Barytfraktion wurde einer 16stündigen Hydrolyse mit 25proz. Schwefelsäure unterworfen. Das zehnfach verdünnte Hydrolysat ergab bei einfacher Destillation mit Magnesia 0,070 g in 100 ccm = 22,7 Proz. des Gesamt-N. Beim Verfahren nach *Folin* 0,01190 Proz. = 38,6 Proz. des Gesamt-N.

Harnstoff als solcher konnte weder in der Fraktion, noch im Hydrolysat (wie zu erwarten war) nach *Revoltellas*[1]) Vorgange durch das Soja-Vergärungsverfahren nachgewiesen werden. Rechnet man vom Gesamtstickstoff der Fraktion den N des präformierten Ammoniaks als nicht eigentlich dazugehörig ab, 0,308 — 0,035 = 0,273 g N in 100 ccm, und setzt nun diese Zahl = 100 Proz. N und führt man die analoge Rechnung auch bei den einzelnen Spaltungsversuchen durch, so ergibt sich, daß vom ganzen N als NH_3 abgespalten worden ist:

Bei der Harnstoffbestimmung nach *Folin* 3,3 Proz. des Gesamt-N.

Bei der Destillation mit Barytwasser oder unter Zusatz von Baryt in Substanz 2,7 Proz. des Gesamt-N.

Bei der Hydrolyse mit 25proz. Schwefelsäure 12,8 Proz. des Gesamt-N.

Bei der Kombination der Schwefelsäurehydrolyse mit dem Folinverfahren 30,7 Proz. des Gesamt-N.

Bereits dieser Versuch belehrt uns in eindeutiger Weise darüber, daß die Vorstellung (s. oben), daß die Oxyproteinsäuren im wesentlichen nicht Eiweiß, sondern Harnstoffderivate seien, definitiv *abgelehnt* werden muß, da selbst die kombinierte Hydrolyse erst mit 25proz. Schwefelsäure und dann mit konzentrierter Salzsäure bei etwa 150° in diesem Falle nicht einmal ein Drittel des Stickstoffs als Ammoniak abzuspalten vermochte.

Versuch B.

Es wurde nunmehr aus 1½ Litern normalen Menschenharns die Barytfraktion nach dem Verfahren von *Fürth* (s. oben) abgetrennt, mit der Abweichung jedoch, daß bei dem Vergärungsvorgang mit Hilfe der Soja-Urease die neueren Erfahrungen, die *Revoltella* in diesem Laboratorium gewonnen hat, verwertet worden sind. Die so gewonnene Fraktion enthielt 0,133 g in 100 ccm N = 100 Proz. des Gesamt-N und $\begin{matrix}0{,}075\\0{,}074\end{matrix}$ g N in 100 ccm durch Quecksilberacetat fällbaren Oxyproteinsäure-N = 56,7 Proz. des Gesamt-N.

Die Fraktion enthielt noch ziemlich erhebliche Mengen durch Destillation mit Magnesia als *Ammoniak* auftretenden N[2]): $\left.\begin{matrix}0{,}030\\0{,}028\end{matrix}\right\}$ 0,029 g in 100 ccm = 21,9 Proz. des Gesamt-N.

[1]) *G. Revoltella*, diese Zeitschr. **134**, 336, 1922.

[2]) Die *Fürth*sche Vorschrift (l. c., S. 453, e) verlangt die Vertreibung des Ammoniaks aus dem alkoholischen Filtrate des Harnsirups in folgender Weise: Nunmehr werden 100 ccm gesättigten Barytwassers (für je 100 ccm Harn) hinzugefügt und eventuell nach Zusatz von Wasser so lange gekocht, als das Entweichen alkalischer Dämpfe nachweisbar ist. Zum Schluß überzeugt man sich, daß ein Barytüberschuß vorhanden ist, indem man sieht, ob ein mit dem Glasstab herausgenommener Tropfen in Phenolphthalein getauchtes Papier noch färbt. Es scheint, daß die vorgeschriebene Menge Barytwassers nicht für alle Harne genügt, und empfiehlt es sich deshalb, auf 300 ccm Barytwasser für je 100 ccm Harn zu nehmen. *Sassa* (l. c., S. 206) äußert sich über diesen Punkt folgendermaßen: „Es hat sich gezeigt, daß eine sehr geringe Menge Ammoniak immer in der Barytfraktion

Nach der Beseitigung alles durch Magnesia eliminierbaren N wurde bei weiterer andauernder *Destillation* mit *Ätzbaryt* in Substanz noch $\left.\begin{matrix}0,032\\0,033\end{matrix}\right\}$ 0,0325 g N in 100 ccm = 24,6 Proz. des Gesamt-N als Ammoniak entwickelt.

Durch die *Folinprozedur* wurde gewonnen: $\left.\begin{matrix}0,047\\0,050\end{matrix}\right\}$ 0,0485 g N in 100 ccm = 36,6 Proz. des Gesamt-N.

Durch die *Folinprozedur nach vorangegangener 16 stündiger Hydrolyse mit 25 proz. Schwefelsäure* dagegen $\left.\begin{matrix}0,084\\0,087\end{matrix}\right\}$ 0,0865 g N in 100 ccm = 65,4 Proz. des Gesamt-N, während bei einfacher Magnesiadestillation des Hydrolysats sich nur fanden $\left.\begin{matrix}0,039\\0,036\end{matrix}\right\}$ 0,0375 g N in 100 ccm = 28,4 Proz. des Gesamt-N.

Die Fällung des Hydrolysats mit Phosphorwolframsäure ergab $\left.\begin{matrix}0,0490\\0,0470\end{matrix}\right\}$ 0,0480 g N in 100 ccm = 36,3 Proz. des Gesamt-N. Von Harnstoff als solchem konnte nach dem Vorgange von *Revoltella* auch diesmal keine Spur gefunden werden.

Bringt man auch in diesem Falle den der Fraktion sozusagen „per nefas" anhaftenden Ammoniak-N überall in Abzug, so ergibt sich folgendes Bild:

Bei Destillation mit Baryt entwickelten sich noch 0,0325 g N in 100 ccm = 31,2 Proz. des Gesamt-N.

Durch die Folinprozedur wurden gewonnen 0,0195 g in 100 ccm = 18,7 Proz. des Gesamt-N.

Durch die Folinprozedur nach vorangegangener 16stündiger Hydrolyse mit 25proz. H_2SO_4 0,0575 g N in 100 ccm = 55,3 Proz. des Gesamt-N, wogegen die Hydrolyse mit 25proz. H_2SO_4 nur ergeben hat 0,0085 g N in 100 ccm = 8,2 Proz. des Gesamt-N.

In diesem Falle war es also immerhin durch den stärksten Eingriff (erst Hydrolyse mit 25proz. H_2SO_4 und dann noch Einwirkung von konzentrierter HCl bei etwa 150°) gelungen, mehr als die Hälfte des vorhandenen Stickstoffs zu lockern und zu entbinden. Daß aber sicherlich nicht die Hauptmenge des N in der Fraktion in Form von Harnstoffkomplexen irgendwelcher Art enthalten war, ergibt sich schon aus dem Umstande, daß die Folinprozedur als solche kaum ein Fünftel des Stickstoffs frei zu machen vermochte.

Versuch C.

Schließlich wurde als Stichprobe eines „*Kachexieharns*" noch der Harn eines im kachektischen Stadium befindlichen Falles von Morbus Addisoni untersucht.

---

bestimmbar ist, und es ist wahrscheinlich, daß das Ammoniak teilweise erst bei der Bestimmung durch Spaltung der Oxyproteinsäuren entsteht." Die Menge desselben hat er allerdings immer nur gering (2 bis 4 Proz. des Baryt-N) gefunden, derart, daß in unserem Falle angenommen werden muß, daß die Beseitigung des (aus Harnstoff durch Vergärung in großen Mengen entstandenen) Ammoniaks doch nicht ganz gelungen ist.

Gesamt-N der Barytfraktion 0,0399 g N in 100 ccm = 100 Proz. des Gesamt-N.

Der durch Quecksilberacetat fällbare Oxyproteinsäure-N betrug $\left.\begin{matrix}0,0308\\0,0322\end{matrix}\right\}$ 0,0315 g N in 100 ccm = 78 Proz. des Gesamt-N.

Bei einfacher Destillation mit Magnesia ergab die Fraktion 0,0112 g N in 100 ccm = 28 Proz. des Gesamt-N.

Bei weiterer Destillation (nach beendigter Magnesiadestillation) unter Zusatz von Baryt in Substanz noch $\left.\begin{matrix}0,0084\\0,0084\end{matrix}\right\}$ 0,0084 g N in 100 ccm = 21,5 Proz. des Gesamt-N.

Durch 16stündige Hydrolyse mit 25proz. H_2SO_4 wurde in Freiheit gesetzt $\left.\begin{matrix}0,0252\\0,0280\end{matrix}\right\}$ 0,0266 g N in 100 ccm = 66,6 Proz. des Gesamt-N.

Durch die Folinprozedur dagegen 0,0315 g N in 100 ccm = 78,9 Proz. des Gesamt-N.

Der durch Phosphorwolframsäure fällbare Anteil des Hydrolysats war (angesichts des Umstandes, daß ja auch der NH_3-N durch das Reagens gefällt wird) sehr erheblich: 0,0270 g N in 100 ccm = 67,6 Proz. des Gesamt-N.

Bei sinngemäßer Abrechnung des der Fraktion anhaftenden Ammoniak-N resultiert das folgende Bild:

Nach Beseitigung des NH_3 noch durch Erwärmen mit Barytlösung in Form von NH_3 abspaltbar 29,3 Proz. des Gesamt-N.

Durch die Folinprozedur als NH_3 abspaltbar 73,3 Proz. des Gesamt-N.

Durch 16stündiges Kochen mit 25proz. H_2SO_4 als NH_3 abspaltbar 53,7 Proz. des Gesamt-N.

Überblicken wir also die vorliegenden Spaltungsversuche, so ergibt sich, daß von dem Gesamt-N der Barytfraktion nach Abzug des derselben anhaftenden Ammoniak-N nachstehende Anteile durch hydrolytische Einwirkung als Ammoniak-N abgespalten worden sind:

	1.	2.	3.
	Alte Barytfraktion Proz.	Barytfraktion aus normalem Menschenharn Proz.	Barytfraktion aus dem Harn e. kachektischen Individuums Proz.
Durch Destillation mit Barytwasser	2,7	31,2	29,3
Bei 16stündiger Hydrolyse mit 25 proz. H_2SO_4	12,8	8,2	53,7
Durch das Folinverfahren (Erhitzen mit konzentrierter HCl plus $MgCl_2$ auf etwa 150 Proz.)	3,3	18,7	73,3
Durch Kombination von H_2SO_4-Hydrolyse mit dem Folinverfahren	30,7	55,3	—

Wir können aus den vorliegenden Versuchsdaten so viel entnehmen, daß zwischen den unter dem Sammelbegriff „Oxyproteinsäuren" zusammengefaßten Harnbestandteilen sehr große Unterschiede in bezug auf die Festigkeit der Bindung des darin enthaltenen Stickstoffs bestehen. Aus allen läßt sich ein mehr oder minder großer Stickstoffanteil sowohl durch Alkali als auch durch Säurehydrolyse abspalten. Es liegt kein Grund vor, daran zu zweifeln, daß ein großer Anteil des Stickstoffs stets in fester Bindung (etwa nach Art der NH_2-Bindung der Aminosäuren und Polypeptide) darin enthalten sei.

Weitere Untersuchungen dieses Laboratoriums sollen Aufschluß darüber gewähren, ob unter gewissen pathologischen Bedingungen die Stickstoffverteilung innerhalb der Oxyproteinsäurefraktion irgendwie charakteristische Verschiebungen erfahre.

Zusammenfassung.

Zum Studium der Festigkeit der Stickstoffbindungen in der Oxyproteinsäurefraktion des Menschenharns wurden solche Präparate benutzt, die nach dem Verfahren von *O. Fürth* nach vorausgegangener Beseitigung des Harnstoffs durch Vergärung mit Soja-Urease gewonnen worden waren und bei denen daher eine Verunreinigung der Oxyproteinsäuren durch beigemengte Harnstoffreste von vornherein völlig ausgeschlossen war. Es hat sich die Irrigkeit der Behauptung ergeben, der zufolge die Oxyproteinsäuren nicht den Eiweißkörpern, vielmehr dem Harnstoff nahestehen sollten. In Übereinstimmung vielmehr mit *Edelbachers* neuester Untersuchung spricht nichts gegen die Annahme, daß sicherlich ein großer Teil des in den Oxyproteinsäuren enthaltenen N polypeptidartigen Charakter trage und festgebundener Amino-N sei. Ein anderer Anteil des Stickstoffs befindet sich allerdings in einer derartigen Bindung, daß er durch Barythydrolyse oder aber durch Säurehydrolyse (16stündiges Kochen mit 25proz. H_2SO_4 und in noch ausgiebigerer Weise durch das Folinverfahren mit konzentrierter Salzsäure bei etwa 150°) gelockert und als Ammoniak abgespalten werden kann.

Zur Frage der biologischen Sauerstoffübertragung durch Sulfhydrylgruppen.

Von

Robert E. Mark.

(Aus der chemischen Abteilung des Wiener physiologischen Universitäts instituts.)

(Eingegangen am 12. Oktober 1924.)

Szent-Györgyi[1]) glaubte durch qualitative Mikroversuche auf Grund beobachteter Kohlensäureentwicklung gezeigt zu haben, daß sich Thioglykolsäure mit dem molekularen Sauerstoff der Luft zu einem sehr aktiven Peroxyd verbindet und befähigt ist, Ameisensäure, Essigsäure und Milchsäure bei einer Temperatur von 37° C zu oxydieren. Dadurch schien eine weitere Stütze für die aus den Arbeiten von *O. Meyerhof*[2]) und *F. G. Hopkins*[3]) über eine weitgehende Bedeutung der Sulfhydrylgruppen für die Zellatmung resultierende Anschauung gegeben.

Wir haben uns nun die Frage vorgelegt, inwieweit eine oxydative Zerstörung der Milchsäure durch den Sauerstoff der Luft bei Gegenwart von Thioglykolsäure quantitativ feststellbar sei. Vorausschicken wollen wir, daß die Versuche negativ ausgefallen sind und keine meßbare Zerstörung von Milchsäure eingetreten ist.

Wir bedienten uns der Milchsäurebestimmungsmethode nach *v. Fürth* und *Charnass*[4]) und konnten bei wiederholten Kontrollversuchen mit dieser Methode bei reinen Milchsäurebestimmungen nur ± 5 Proz. Fehler feststellen.

Verwendete Lösungen:

1. Lithiumlactat, etwa 1proz.
2. Thioglykolsäure in wässeriger Lösung, 1proz.
3. m/10 Eisenammoniumsulfat (*Mohr*sches Salz).

---

[1]) *A. v. Szent-Györgyi*, diese Zeitschr. **146**, 254, 1924.

[2]) *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. **199**, 531, 1923.

[3]) *F. G. Hopkins*, Biochem. Journ. **15**, 286, 1921; *Hopkins* und *Dixon*, Journ. of biol. Chem. **54**, 527, 1922.

[4]) *O. v. Fürth* und *Charnass*, diese Zeitschr. **26**, 199, 1920.

Versuchsanordnung.

Ein abgemessenes Volumen Milchsäure in Form von Lithiumsalz wurde mit 10 ccm der 1proz. Thioglykolsäurelösung versetzt und 2 ccm der Eisenlösung zugegeben. Nach Zufügung des gleichen Volumens destillierten Wassers wurde die Mischung nun in einer Waschflasche für mehrere Stunden im Wasserbade von 40° C bei Durchleitung eines durch Vorschaltung von zwei mit Barytwasser beschickten Waschflaschen kohlensäurefrei gemachten Luftstromes belassen. Dann wurde die Mischung quantitativ in den Milchsäurebestimmungsapparat gebracht. Es fiel auf, daß die Mischung bis zur vollständigen Oxydation eine relativ große Menge Permanganat verbrauchte und die Oxydation zwei- bis dreimal längere Zeit als gewöhnlich in Anspruch nahm. Weiter wurde während der Destillation nach ½- bis ¾stündigem Kochen in der vorgelegten Kaliumbisulfitlösung eine opaleszierende Trübung bemerkt, die am Ende der Destillation sich verdichtete.

1. Versuch.

40 ccm Lithiumlactat (= 393 mg entsprechend 369 mg Milchsäure) + 20 ccm Thioglykolsäure + 4 ccm Eisenlösung + 60 ccm destilliertes Wasser für 3 Stunden bei 40° C im Wasserbade. Luftstrom. Ein aliquoter Teil (Hälfte) ergibt bei der Milchsäurebestimmung 248 mg = 140 Proz. Die zweite Hälfte ergibt nach dreitägigem Stehen 157 mg = 85 Proz.

20 ccm Lithiumlactat (= 184 mg Milchsäure) + 10 ccm Thioglykolsäure + 2 ccm Eisenlösung + 30 ccm destilliertes Wasser für 3 Stunden bei 40° C im Wasserbade. Luftstrom. Milchsäurebestimmung ergibt bei einem Verbrauch von 1000 ccm n/50 Permanganat 162 mg = 88 Proz.

Dieselbe Anordnung (= 184 mg Milchsäure). Die Milchsäurebestimmung ergibt 181 mg = 98 Proz.

Dieselbe Anordnung (= 184 mg Milchsäure). Bei einem Verbrauche von etwa 1080 ccm n/50 Permanganat ergibt die Milchsäurebestimmung 143 mg = 78 Proz.

Dieselbe Anordnung (= 184 mg Milchsäure). Verbrauch von 1100 ccm n/50 Permanganat. Milchsäurebestimmung 178 mg = 97 Proz.

Wie die Milchsäurewerte zeigen, scheinen bei Anwesenheit von Thioglykolsäure unerklärte Prozesse zu verlaufen, die einerseits die Aldehydbildung aus der Milchsäure hemmen, andererseits Aldehyd aus Thioglykolsäure möglicherweise abspalten.

Der Blindversuch mit Thioglykolsäure und Eisenlösung im Milchsäurebestimmungsapparat zeigte nur ganz geringe Mengen Aldehyd in der Kaliumbisulfitvorlage (7 mg), was innerhalb der Fehlergrenzen der Methode liegen dürfte. Es dauerte aber dennoch 2 Stunden bis zur Braunsteinabscheidung bei einem Verbrauch von 500 ccm n/50 Permanganatlösung.

Um die anscheinend störende Wirkung der Thioglykolsäure bei der Milchsäurebestimmung zu beseitigen, wurde diese ausgefällt:

Thioglykolsäure läßt sich quantitativ mit Bleiacetat als flockiger, gelblichweißer Niederschlag, mit Silberacetat als grobflockiger, grünlich-schwarzer Niederschlag ausfällen. Eine Mischung von Lithiumlactat, Thioglykolsäure und Eisenlösung wurde in der Kälte mit Bleiacetat oder Silberacetat im Überschuß versetzt und nach Abnutschen des Niederschlages und Nachwaschen die Milchsäure nach *v. Fürth* und *Charnass* bestimmt.

2. Versuch.

20 ccm Lithiumlactat (= 184 mg Milchsäure) + 10 ccm Thioglykolsäure + 2 ccm Eisenlösung werden mit 40 ccm Silberacetat (10proz.) versetzt. Nach Entfernung des Niederschlages ergibt die Milchsäurebestimmung bei einem Verbrauch von 220 ccm n/50 Permanganat 183 mg = 99 Proz.

20 ccm Lithiumlactat (= 184 mg Milchsäure) + 10 ccm Thioglykolsäure + 2 ccm Eisenlösung werden mit 20 ccm 10proz. Bleiacetatlösung versetzt. Nach Entfernung des Niederschlages ergibt die Milchsäurebestimmung bei einem Verbrauch von 290 ccm n/50 Permanganat 203 mg = 110 Proz.

40 ccm Lithiumlactat (= 368 mg Milchsäure) + 10 ccm Thioglykolsäure + 2 ccm Eisenlösung werden mit 40 ccm Silberacetat (10proz.) versetzt. Nach Beseitigung des Niederschlages ergibt die Milchsäurebestimmung bei Verbrauch von 230 ccm n/50 Permanganat 375 mg = 102 Proz.

Die Milchsäure wurde also in diesem Versuch vollständig wiedergefunden.

Eine andere Versuchsreihe wurde derart ausgeführt, daß die Mischung im Wasserbade bei 60° C unter Durchleitung eines kohlensäurefreien Luftstromes für 3, 6, 7, 9 Stunden gehalten und nachher nach Ausfällung der Thioglykolsäure die Milchsäure bestimmt wurde. Bei dieser Anordnung wurde in einer Waschflasche n/5 Barytlösung nachgeschaltet, um die meßbaren Mengen Kohlensäure aufzufangen. Es wurde dann nach Zusatz von Phenolphthalein als Indikator mit n/5 Salzsäure titriert.

3. Versuch.

20 ccm Lithiumlactat (= 184 mg Milchsäure) + 10 ccm Thioglykolsäure + 2 ccm Eisenlösung für 3 Stunden bei 60° im Wasserbade. Luftstrom. Nach Ausfällung der Thioglykolsäure mit 40 ccm Silberacetat (10proz.) und Entfernung des Niederschlages ergibt die Milchsäurebestimmung bei einem Verbrauch von 260 ccm n/50 Permanganat 173 mg = 94 Proz.

10 ccm Lithiumlactat (= 92 mg Milchsäure) + 10 ccm Thioglykolsäure + 2 ccm Eisenlösung + 20 ccm destilliertes Wasser für 3 Stunden im Wasserbade. Luftstrom. Die entwickelte Kohlensäure entspricht 7,5 ccm n/5 Salzsäure. Nach Entfernung der Thioglykolsäure mit 40 ccm der 10proz. Silberacetatlösung ergibt die Milchsäurebestimmung bei einem Verbrauch von 280 ccm n/50 Permanganat 91 mg = 99 Proz.

10 ccm Lithiumlactat (= 92 mg Milchsäure) + 10 ccm Thioglykolsäure + 2 ccm Eisenlösung + 20 ccm destilliertes Wasser bei 60° C für 6 Stunden im Wasserbade. Luftstrom. Die entstandene Kohlensäure entspricht 11,8 ccm n/5 Salzsäure. Nach Entfernung der Thioglykolsäure mit 40 ccm Silberacetat (10proz.) ergibt die Milchsäurebestimmung bei einem Verbrauch von 280 ccm n/50 Permanganat 81 mg = 88 Proz.

Dieselbe Anordnung für 7 Stunden im Wasserbade. Die entstandene Kohlensäure entspricht 8,9 ccm n/5 Salzsäure. Verbrauch von 280 ccm n/50 Permanganat. Die Milchsäurebestimmung ergibt 92 mg = 100 Proz.

Dieselbe Anordnung für 9 Stunden im Wasserbade. Die erzeugte Kohlensäure entspricht 8,9 ccm n/5 Salzsäure. Die Milchsäurebestimmung ergibt 90 mg = 98 Proz.

Bei allen Versuchen mit Ausfällung der Thioglykolsäure und Entfernung des Niederschlages wurden wieder normal große Mengen n/50 Permanganat zur Oxydation der Milchsäure verbraucht. Die Milchsäurewerte selbst entsprachen der vorgelegten Menge. So war nun zunächst festgestellt, daß die gefundene Kohlensäure keiner groben quantitativ meßbaren Milchsäurezerstörung entspräche.

Es galt nun zu prüfen, ob die entstandene Kohlensäure von Thioglykolsäure allein abgespalten wird. *Szent-Györgyi* (l. c.) hatte bei 37° nach kurzer Zeit bei Thioglykolsäure keine Trübung des Barytwassers gefunden. Diese Tatsache konnten wir auch im kurzdauernden Experiment bestätigen. Allein schon bei 1½stündiger Durchlüftung im Wasserbade waren meßbare Mengen Kohlensäure aufgetreten. Mit steigender Temperatur wurde die Reaktionsgeschwindigkeit vermehrt.

4. Versuch.

Thioglykolsäure und Eisenlösung bei 40° im Wasserbade für ½ Stunde. Energischer Luftstrom (kohlensäurefrei). Ganz leichte Trübung.

Dieselbe Anordnung bei 40° für 1½ Stunden. Die produzierte Kohlensäure entspricht 0,35 ccm n/5 HCl.

Dieselbe Anordnung bei 60° für 1½ Stunden. Die produzierte Kohlensäure entspricht 1,25 ccm n/5 HCl.

Dieselbe Anordnung bei 60° für 4 Stunden. Die produzierte Kohlensäure entspricht 6,3 ccm n/5 HCl.

Wir müssen nach diesen Versuchsergebnissen annehmen, daß Thioglykolsäure an sich in der Wärme Kohlensäure abzuspalten vermag.

Es war nun die nächste Aufgabe, nachzuweisen, in welchem Ausmaß diese Kohlensäureabspaltung durch die Anwesenheit der Milchsäure beschleunigt wird.

5. Versuch.

In einem Wasserbade von 40° C wurde durch zwei Waschflaschen für 3 Stunden ein langsamer Luftstrom (kohlensäurefrei) geleitet. Dem System waren zwei mit n/5 Barytlösung gefüllte Waschflaschen nachgeschaltet. Es war durch Quetschhähne ermöglicht, durch beide Systeme einen gleichmäßig starken Luftstrom zu senden.

Die erste Waschflasche enthielt 10 ccm Lithiumlactat + 10 ccm Thioglykolsäure + 2 ccm Eisenlösung. Die entwickelte Kohlensäure entsprach 0,6 ccm n/5 HCl.

Die zweite Waschflasche enthielt 10 ccm Lithiumlactat + 2 ccm Eisenlösung. Die entwickelte Kohlensäure entsprach 0,4 ccm n/5 HCl.

Dieselbe Anordnung bei 60° Wasserbad ergab für das System: Milchsäure + Thioglykolsäure + Eisenlösung als Kohlensäurewert 2,4 ccm n/5 HCl.

Für das System: Thioglykolsäure + Eisenlösung als Kohlensäurewert 0,95 ccm n/5 HCl.

Die Doppelversuche bei 40 und 60° sprechen dafür, daß bei Anwesenheit von Milchsäure die Kohlensäurebildung gesteigert ist. Da unsere vorerwähnten Versuche zeigen, daß die Milchsäure als solche unzerstört bleibt, so müssen wir annehmen, daß die Milchsäure eine leicht katalytische Wirkung bei der Zersetzung der Thioglykolsäure entfaltet.

Von der durch die Arbeiten von *v. Fürth* und *Lieben*[1]) festgestellten Tatsache ausgehend, daß in einer gelüfteten Hefesuspension Milchsäure zerstört wird, haben wir nun noch geprüft, ob etwa diese Milchsäurezerstörung durch Hefe bei Anwesenheit von Thioglykolsäure beschleunigt wird. Nach dem Verfahren von *v. Fürth* und *Lieben* haben wir im Schüttelapparat gleichzeitig eine Hefesuspension unter Zusatz von milchsaurem Lithium mit und ohne Thioglykolsäure 6 Stunden lang bei Luftdurchströmung geschüttelt und dann nach Ausschüttlung mit Amylalkohol und Natriumcarbonat im Scheidetrichter die Milchsäure nach *v. Fürth* und *Charnass* bestimmt. Da wir für diesen Versuch offenbar besonders wirksame Preßhefe verwendet haben, ist die ausgiebige Milchsäurezerstörung erklärlich.

6. Versuch.

In einem Schüttelkolben wurden 25 g Preßhefe[2]) in 120 ccm Leitungswasser suspendiert, 30 ccm Lithiumlactat (= 219 mg Milchsäure) zugefügt zusammen mit 10 ccm Thioglykolsäure und 6 Stunden geschüttelt.

Entsprechend vorgelegten 219 mg Milchsäure + 21 mg Milchsäure in der Hefesuspension, also zusammen 240 mg Milchsäure ergab sich aus dem verwendeten aliquoten Teil für die erste Probe eine Gesamtmilchsäuremenge von 87 mg = 36 Proz.

Aus der zweiten Probe fand sich ein Gesamtmilchsäurewert von 75 mg = 31 Proz., das ist im Mittel 33,5 Proz.

In einem zweiten Schüttelkolben dieselbe Anordnung ohne Thioglykolsäure.

Die Milchsäurebestimmung ergibt in einem aliquoten Teil bei einem Verbrauch von etwa 100 ccm n/50 Permanganat einen Gesamtmilchsäurewert von 72 mg = 30 Proz.

---

[1]) *O. v. Fürth* und *F. Lieben*, diese Zeitschr. **128**, 144, 1922.
[2]) In 25 g Preßhefe waren 21 mg Milchsäure enthalten.

Es zeigt sich in beiden Fällen kein wesentlicher Unterschied. Thioglykolsäure vermag also nicht die Milchsäurezerstörung durch Hefe zu beschleunigen.

Zusammenfassung.

Die bei Einwirkung von Thioglykolsäure auf Milchsäure im Luftstrome bei 40° C abgespaltene Kohlensäure entstammt nicht der quantitativ wiedergefundenen Milchsäure, vielmehr scheint die letztere in geringem Ausmaß auf die im Luftstrome schon bei niedriger Temperatur erfolgende Kohlensäureabspaltung aus der Thioglykolsäure katalytisch zu wirken.

Nachschrift.

Aus einer kürzlich erschienenen, erst nach Abschluß der vorliegenden Arbeit zu unserer Kenntnis gelangten kurzen Mitteilung von *A. v. Szent-Györgyi*[1]) scheint hervorzugehen, daß auch er an der ursprünglichen Deutung seiner Versuche nicht mehr festhält. Er sagt nämlich: „Indem ich die Versuche jetzt nach einiger Zeit mit neuen Chemikalien zu wiederholen suche, gelingt es mir nicht, durch Thioglykolsäure ähnliche Oxydationen zu erhalten, so daß ich das damals erhaltene positive Resultat gewissen störenden Einflüssen, vielleicht einer Anhäufung von Peroxyden in meiner damals verwendeten alten, möglicherweise durch Oxydation veränderten Thioglykolsäure zuschreiben muß.“

---

[1]) *A. v. Szent-Györgyi*, diese Zeitschr. **149**, 188, Juni 1924.

Eine Ansatzelektrode zur p_H-Bestimmung in festen Nährböden.

Von

W. Radsimowska.

(Aus dem Laboratorium für physiologische Chemie des Kiewer medizinischen Instituts.)

(Eingegangen am 13. Oktober 1924.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Für eine ganze Reihe von experimentellen Untersuchungen ist die Methode der p_H-Bestimmung noch nicht mit genügender Vollkommenheit ausgearbeitet; dieser Umstand hemmt in bedeutendem Maße die Erforschung des Einflusses, der von den Wasserstoffionen auf diese oder jene Lebensprozesse ausgeübt wird.

Speziell die elektrometrische Methode der $(H^{\bullet})$-Bestimmung war bis jetzt weder zur p_H-Messung in einzelnen, auf festen Nährböden (wie z. B. Agar-Agar) wachsenden Bakterienkolonien, noch auch zur Erforschung der Reaktion in den Gewebskulturen angewandt worden. Das Fehlen einer diesen Zwecken angepaßten Methode macht sich noch mehr geltend, wenn es sich darum handelt, die p_H-Bestimmung eines Objektes auszuführen, ohne dabei seine Integrität zu zerstören.

Die näher zu beschreibende Elektrode, die speziell zu den oben genannten Zwecken von mir konstruiert wurde, erfüllt nach meiner Ansicht die vorher angeführten Forderungen.

Ihrer Konstruktion nach steht die vorgeschlagene Elektrode der von *Lehmann*[1]) zur $(H^{\bullet})$-Messung in kleinen Flüssigkeitsmengen bestimmten Mikroelektrode am nächsten.

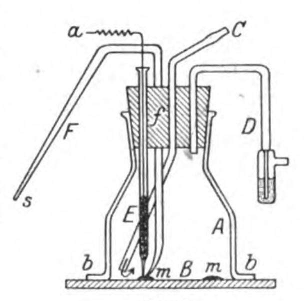


Abb. 1.

Die Abb. 1 gibt schematisch die Konstruktion der Ansatzelektrode wieder.

Das Elektrodengefäß *A*, an beiden Enden offen, wird auf einen Deckel *B* aufgestellt, auf dem die zu bestimmenden Objekte sich befinden; der angeschliffene Teil *b* wird mit einem Gemisch von Wachs und Vaselin bedeckt.

---

[1]) *Lehmann*, diese Zeitschr. **139**, 213, 1923.

Der obere Gummistopfen *f* enthält vier Öffnungen. Die eine dient zum Durchlassen eines gläsernen Röhrchens mit einer eingeschmolzenen Platinelektrode; durch eine zweite Öffnung geht ein Röhrchen *F* mit Agar[1]). Die Röhrchen sind derart angeordnet, daß sich auf dem Objekt *m* (Kultur und dergleichen) ein Halbelement bildet; der Strom wird durch *a* und *s* abgeleitet. Die beiden anderen Öffnungen dienen zur Zu- und Abfuhr des Wasserstoffes.

Die p_H-Bestimmung wird in der folgenden Weise ausgeführt: durch das angefertigte und von unten mittels einer Glasplatte abgeschlossene Gefäß wird ein Wasserstoffstrom etwa 15 bis 20 Minuten durchgeleitet; sodann wird, ohne die Zuführung des Wasserstoffs zu unterbrechen, unter das Gefäß anstatt der gläsernen Platte eine runde Glasplatte, z. B. der Deckel einer Gabritschewskischale, mit dem darauf befindlichen Objekt untergeschoben. Diese Glasplatte muß einen abgeschliffenen Rand haben (*b*), entsprechend dem abgeschliffenen Rand des Elektrodengefäßes. Das zu untersuchende Objekt wird unter die Platinelektrode gebracht und, indem man diese auf und ab bewegt, erreicht man eine derartige Stellung, daß der Platindraht gerade die Oberfläche des Objektes berührt. Mit dem letzteren muß auch das Vereinigungsröhrchen mit der Agar-Kaliumchloridlösung *F* in Kontakt stehen. In 15 bis 20 Minuten erreicht das an der Berührungsstelle der Elektroden mit dem Objekt, an dem p_H zu bestimmen ist, entstehende Potential seinen konstanten Wert und kann durch die Kompensationsmethode von *Poggendorf* bestimmt werden. Zur Einleitung in die Kette dient einerseits der Draht *a*, welcher in das Quecksilber der Platinelektrode eintaucht, anderseits die Spitze des Röhrchens *F*.

Das Platinieren der Elektrode, das Reduzieren usw. wird wie üblich ausgeführt[2]).

Außerhalb des Gebrauchs wird die Elektrode in destilliertem Wasser aufbewahrt.

Um nach Möglichkeit ein schnelles Austrocknen des Objektes, an dem p_H bestimmt wird, zu vermeiden, stellt man auf die Glasplatte der Elektrode eine kleine flache Schale mit Wasser und leitet den Wasserstoff so durch, daß im Laufe einer Sekunde zwei bis drei Gasbläschen durchlaufen.

Hat man die Reaktion eines Nährbodens zu bestimmen, welcher bei der Bestimmung CO_2 verliert, so wird die Messung so

---

[1]) Benutzt wird eine 2proz. Agarlösung in 40proz. KCl. Die Agarlösung wird in heißem Zustande in das Röhrchen eingefüllt.

[2]) *Michaelis*, Wasserstoffionenkonzentration; *W. Radsimowska*, Über den Einfluß der Wasserstoffionen auf das Leben der Gewebszellen. Kiew 1924 (russisch).

ausgeführt, wie bei anderen Elektroden, welche zur Arbeit mit einem konstanten Wasserstoffstrom konstruiert sind[1]).

Natürlich kann diese Elektrode auch zur p_H-Bestimmung im flüssigen Nährboden benutzt werden.

Beim Vergleich der mittels der beschriebenen Ansatzelektrode erhaltenen Angaben über die p_H-Bestimmung in den üblichen Puffergemischen (*Sörensen*, *Michaelis* u. a.) mit den Angaben, welche die Anwendung der U-förmigen Elektrode von *Michaelis* ergibt, übertreffen die Abweichungen nicht ein Millivolt.

Eine spezielle Arbeit wird die Ergebnisse von p_H-Untersuchungen in einzelnen Bakterienkolonien bei Anwendung dieser Elektrode enthalten.

---

[1]) *Schade*. Die physikalische Chemie in der inneren Medizin. 1923.

Über die spezifisch-dynamische Wirkung der Nahrungsstoffe.

IV. Mitteilung:

Über den Mechanismus der spezifisch-dynamischen Wirkung.

Von

J. Abelin.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 29. Oktober 1924.)

Einführung.

Unter den zahlreichen Problemen der Stoffwechselphysiologie nimmt die Frage der spezifisch-dynamischen Wirkung ihrer praktischen sowie theoretischen Bedeutung wegen eine besonders wichtige Stellung ein. In den ersten Anfängen der Stoffwechsellehre entstanden, wurde sie bereits von *Lavoisier* bearbeitet und ist bis heute noch nicht aufgeklärt. Der Ausdruck spezifisch-dynamische Wirkung stammt bekanntlich von *M. Rubner*. Er versteht darunter eine Erhöhung der Wärmeproduktion nach der Nahrungsaufnahme, die in fast keiner Beziehung zum Wärmebedarf des Organismus steht. Die gleiche Erscheinung wurde von *Speck*, *v. Mehring* und *Zuntz* früher als Verdauungsarbeit bezeichnet. Auf die bekannte Diskussion darüber, ob die spezifisch-dynamische Wirkung auf einer Anregung der Verdauungs- und Drüsentätigkeit oder auf einer Erhöhung des allgemeinen Zellstoffwechsels beruht, wollen wir hier nicht näher eingehen. *Zuntz*[1]) selbst, der frühere Verfechter der ersten Anschauung, schreibt darüber folgendes: „Wir werden ... zwei Quellen der Stoffwechselsteigerung nach Nahrungsaufnahme annehmen müssen, die Arbeit des Verdauungsapparates und besondere Wirkungen der im Blute zirkulierenden und in die einzelne Organe eintretenden Nährstoffe (von *Rubner* spezifisch-dynamische Wirkung genannt)." Die Annahme eines Zellreizes durch die Nahrungsstoffe bzw. ihre Spaltungsprodukte liegt auch den Anschauungen der meisten Autoren zugrunde (*Tangl*, *Kaufmann*, *Chauveau*

[1]) *N. Zuntz*, und *A. Loewy*, Lehrb. d. Physiol. d. Menschen, 2. Aufl., 1918, S. 660.

und andere mehr). *Fr. v. Müller*[1]) faßt seine Ansicht dahin zusammen, „daß reichliche oder überflüssige Nahrung und besonders Eiweißzufuhr einen gewissen *Reiz* auf die lebenden Zellen ausüben, die Oxydationen steigere und zu einer *überschüssigen* Erwärmung des Körpers und zu einer Erregung des Herzens, der Atmung, des Nervensystems führe". (Sperrdruck im Original.)

Es erhebt sich die wichtige Frage, durch welche Stoffe diese „besonderen Wirkungen" ausgelöst werden. Das Eiweiß als solches kann es nicht sein. Aus den Untersuchungen von *Falta, Grote* und *Staehelin*[2]) ist bekannt, daß auch tief abgebaute Eiweißkörper spezifisch-dynamisch wirken. *G. Lusk*[3]) und *Grafe*[4]) haben gefunden, daß auch einzelne Aminosäuren spezifisch-dynamisch wirken und daß gewisse Aminosäuren, wie z. B. Glykokoll und Alanin, Stoffwechselerhöhungen von 20 bis 40 Proz. verursachen. Wir verdanken *G. Lusk* eine große Reihe sorgfältig durchgeführter Untersuchungen auf diesem Gebiete. Über die Ursachen der spezifisch-dynamischen Wirkung hat *G. Lusk* verschiedene Meinungen geäußert. Nach einer früheren Auffassung von *G. Lusk* soll der Stoffwechselreiz von der Desaminierung der Aminosäuren ausgehen. In späteren Untersuchungen vertritt dagegen *Lusk* den Standpunkt, daß nicht die Aminosäure als solche, sondern die aus der Aminosäure im intermediären Stoffwechsel entstehende Fettsäure bzw. Oxysäure den Reiz auslösenden Faktor darstellt. *F. G. Benedict*[5]) hat bereits 1913 darauf aufmerksam gemacht, daß ein Säureübertritt ins Blut eine Erhöhung der Kalorienproduktion mit sich bringt. Diese Ansicht wurde mehrfach bestätigt. Doch scheint die Frage nach dem „Reizstoff" bis jetzt noch nicht gelöst, und in einer zusammenfassenden Übersicht über die spezifisch-dynamische Wirkung schreibt *G. Lusk*[6]) im Jahre 1922 folgendes: „The specific dynamic action of protein consists in a specific chemical stimulus of the cellular protoplasm, which is independent of the oxidation of the material through which the stimulus is applied. It may be termed the *metabolism of amino-acid stimulation.*" (Sperrdruck im Original.)

Unter diesen Aminosäuren soll Glykokoll und Alanin eine besonders wichtige Stellung einnehmen. Die systematischen Forschungen von *G. Lusk* haben neuerdings eine Reihe wichtiger Tatsachen gebracht. *D. Rapport*[7]) hat auf Anregung von *G. Lusk* die spezifisch-dynamische Wirkung verschiedener Eiweißkörper miteinander verglichen. Es wurden absichtlich solche Eiweißstoffe gewählt, die einen ganz verschiedenen Gehalt an Glykokoll und Alanin aufwiesen. Verwendet wurden Rindfleisch, Gelatine, Casein, Gliadin, Meerfisch (Kabeljau) und Fleisch vom Huhn. Der Gehalt an Glykokoll schwankt in diesen Stoffen zwischen 26 Proz. bei der Gelatine und beinahe Null beim Casein und Gliadin. Auch der Alaningehalt dieser Eiweißkörper ist sehr verschieden. All diese Eiweißstoffe hatten aber,

[1]) *Fr. v. Müller,* Volkmans Sammlung klin. Vortr., Nr. 272; vgl. auch Deutsche med. Wochenschr. 1922, Nr. 16—17 (Leyden-Vorlesung).
[2]) *Falta, Grote* und *Staehelin,* Hofmeisters Beitr. **9**, 1907.
[3]) *G. Lusk,* Journ. of biol. Chem. **12**—**54**.
[4]) *E. Grafe,* Deutsch. Arch. f. klin. Med. **118**, 1915.
[5]) *F. G. Benedict,* ebendaselbst **110**, 1913.
[6]) *G. Lusk,* Medecine **1**, Nr. 2, S. 352, 1922.
[7]) *D. Rapport,* Journ. of biol. Chem. **60**, 497, 1924.

trotz ihrem ganz verschiedenen Aminosäuregehalt, fast gleich stark spezifisch-dynamisch gewirkt. In Fortsetzung dieser Untersuchungen haben dann *R. Weiss* und *D. Rapport*[1]) gefunden, daß die Beigabe von Glykokoll oder von Alanin zu Gelatine (39 g Gelatine = 6 g N) die spezifisch-dynamische Gelatinewirkung *nicht beeinflußt*. Ebenso bleibt die spezifisch-dynamische Wirkung des Caseins *unverändert*, wenn gleichzeitig mit dem Casein Alanin verfüttert wird. *R. Weiss* und *D. Rapport* haben noch eine große Anzahl von solchen Kombinationen ausgeführt und kommen zum Schluß, daß in der spezifisch-dynamischen Wirkung des Eiweißes außer den Aminosäuren Glykokoll und Alanin noch andere unbekannte Faktoren verborgen sind. [„From the foregoing facts, we believe that other important factors, as yet unknown, contribute to or modify the specific dynamic action of protein, apart from the direct influences of the amino acids, glycine and alanine“ [2]).]

Aus dieser kurzen Übersicht, die keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt, geht hervor, daß eine genügende Erklärung der spezifisch-dynamischen Wirkung nicht vorliegt. Wir wollen von vornherein bemerken, daß eine erhöhte Tätigkeit der Verdauungsorgane nach Nahrungsaufnahme unzweifelhaft vorhanden ist, sie kann aber die spezifisch-dynamische Wirkung keinesfalls erklären[3]). Vorherrschend ist die „Reiztheorie“ der spezifisch-dynamischen Wirkung. Wenn wir als Reiz jede Änderung in den Lebensbedingungen betrachten (*Verworn*), so muß natürlich der Nahrungszufuhr eine Reizwirkung zugeschrieben werden. Damit ist aber die *spezifisch-dynamische* Wirkung eines Nahrungsstoffes noch nicht erklärt. Die Reiztheorie läßt die Frage offen, was zersetzt wird, ob die Abbauprodukte der Nahrungsstoffe oder ob dagegen die Zellsubstanz selbst. Die Reiztheorie gibt auch keine Erklärung für die Tatsache, daß manche organische Stoffe, und selbst Nahrungsmittel, wie z. B. die Fette, die resorbiert werden und die auch verbrennbar sind, die Stoffwechselprozesse nicht erhöhen. Es bleibt ferner immer noch vollkommen rätselhaft, warum der Organismus, der sonst so ökonomisch und vielfach so zweckmäßig arbeitet, hier, bei bei Verarbeitung seiner wichtigsten Lebensquellen, so unzweckmäßig vorgeht und 20, 30 bis 40 Proz. der gebildeten Wärme ohne Nutzen für sich nach außen abgibt. So schwer es auch ist, in dieses Geheimnis der Natur einzudringen, so muß doch angestrebt werden, entsprechend dem Stande unserer Kenntnisse, eine wahrscheinliche Erklärung dieses Phänomens zu finden. Wir wollen versuchen, vorerst ganz allgemein, die spezifisch-dynamische Wirkung etwas näher zu analysieren, wobei wir ausschließlich die *Physiologie* der spezifisch-dynamischen Wirkung im Auge behalten wollen. Eine zusammen-

[1]) *R. Weiss* und *D. Rapport*, Journ. of biol. Chem. **60**, 513, 1924.
[2]) *Dieselben*, ebendaselbst **60**, 543, 1924.
[3]) Vgl. *A. Loewy*, Oppenheimers Handb. d. Biochem., 2. Aufl., **6**, 262; *A. Gigon*, Pflügers Arch. **140**, 1911.

fassende Betrachtung der *Pathologie* der spezifisch-dynamischen Wirkung ist zurzeit noch nicht möglich, weil zu wenig Material vorliegt. Zudem scheint die Zahl der möglichen Störungen der spezifisch-dynamischen Wirkung so groß zu sein, daß eine einheitliche Auffassung des ganzen Prozesses, wenigstens vorläufig, gewagt erscheint. Wir werden erst dann an eine Erklärung der Pathologie der spezifisch-dynamischen Wirkung denken können, wenn einmal größere Klarheit über die physiologischen Grundlagen dieses Vorganges herrscht.

Die spezifisch-dynamische Wirkung der Eiweißkörper, der Kohlehydrate und der Fette.

Jede Betrachtung der Stoffwechselprozesse muß von der Grundtatsache ausgehen, daß die Aufgabe der Nahrungsstoffe eine doppelte ist: Die Lieferung der nötigen Energie und die Bereitstellung von Material für die stofflichen Bedürfnisse des Organismus. Fast jeder Nahrungsstoff kann, je nach seinem chemischen Aufbau und je nach den herrschenden Bedingungen, bald mehr den einen, bald mehr den anderen Weg einschlagen. Für beide Teile des Stoffwechsels, für den „dynamischen" und für den „konstitutiven", dient die Verdauung und die Resorption als eine vorbereitende Phase. Das ist der beiden Abschnitten gemeinsame Stamm. Von hier aus beginnt die Verzweigung. Durch eine sehr zahlreiche Verästelung des einen Zweiges, des dynamischen Teiles, werden zuletzt die Stoffwechselendprodukte gebildet und dabei wird das Maximum der Energie frei. Die Verästelung des anderen Zweiges, des konstitutiven, führt seinerseits zu Produkten, welche Zellbestandteile werden können. Beide Zweige anastamosieren vielfach miteinander und fast in jedem Stadium ist ein Übergang aus dem dynamischen in den konstitutiven Teil und auch umgekehrt denkbar. Es ist ohne weiteres ersichtlich, daß sich auch die spezifisch-dynamische Wirkung innerhalb dieser beiden Abschnitte des Stoffwechselprozesses abspielen muß. Gehen wir bei der Betrachtung der spezifisch-dynamischen Wirkung vom Stoffwechsel des erwachsenen Organismus im nüchternen Zustande aus. Die Verarbeitung der Nahrung ist zum allergrößten Teil abgeschlossen. Der Organismus zersetzt Reservematerial, hauptsächlich Fett und etwas Kohlehydrat. Der oxydative Vorgang, die Lieferung der nötigen Energie, ist vorherrschend. Auch der Auf- und Umbaustoffwechsel ist nicht erloschen, er tritt hier aber quantitativ weit zurück. Nun kommt die Nahrungsaufnahme. Hier wären drei Möglichkeiten vorhanden:

1. Der Organismus fährt fort, sein Reservematerial zu verbrennen und lagert die Nahrungsstoffe ab.

2. Der Organismus verbrennt ausschließlich die aufgenommenen Nahrungssubstanzen und stellt die Zersetzung seines Körpermaterials ein.

3. Der Organismus fährt fort, seine Körperbestandteile zu oxydieren und zerlegt außerdem noch die Nahrungsstoffe.

Fall 1 ist deshalb unmöglich, weil ein direkter Übergang von Nahrungsbestandteilen in Körpersubstanz unmöglich ist. Fall 2 ist ebenfalls nicht durchführbar, weil bei einem solchen Vorgang die Restitution des Körpermaterials ausbleiben muß. Es bleibt also nur Fall 3 übrig, wo sich die Nahrungsverbrennung zu der Oxydation des Körpermaterials addiert. Die Folge davon muß eine Steigerung der Oxydation über den Ruheumsatz sein. Damit allein kann aber die spezifisch-dynamische Wirkung nicht erklärt werden. Woher kommt der starke Wärmeverlust in den ersten Stunden nach der Nahrungsaufnahme? Warum treten auf einmal die Oxydationen so heftig auf? Bei einer nicht so rapid verlaufenden Verbrennung wäre vielleicht dem Organismus eher Gelegenheit gegeben, die gebildete Energie für seinen vielseitigen Bedarf auszunutzen. Es bleibt auch unverständlich, warum die Stoffwechselsteigerung nach Eiweißaufnahme größer ist als nach Zuckerzufuhr, während doch Eiweiß und Zucker fast gleich große Mengen von Wärme im Organismus bilden.

Der Wiederersatz des im Zellstoffwechsel verloren gegangenen Materials erfolgt hauptsächlich auf Kosten der aufgenommenen Nahrungsstoffe. Von dem ihr dargebotenen Material kann aber die Zelle nur einen kleinen Teil verwerten, der Rest erscheint als Fremdstoff und muß beseitigt werden. Hier setzt dann die Oxydation ein, die alles, was momentan stofflich nicht ausnutzbar ist, verbrennt und in die Endprodukte überführt. Es erscheint für den Organismus vorteilhafter, das überschüssige Material auch ohne wesentlichen Nutzen für sich zu verbrennen und die Wärme nach außen abzugeben, als durch Zurückhaltung der Nahrungsbestandteile das Milieu der Zellen zu verändern. *Die erhöhte Oxydation nach Nahrungsaufnahme, die sogenannte spezifisch-dynamische Wirkung, erscheint somit nicht nur als ein Reizvorgang durch die Abbauprodukte, sondern eher als eine Schutzmaßnahme des Organismus.* Diese Verschwendung der Energie birgt gleichzeitig einen wichtigen Sicherheitsfaktor in sich. Das jeweilige Aufnahmevermögen der Zellen für neues Material bestimmt nicht nur die Größe des konstitutiven, sondern zugleich auch die Höhe des dynamogenen Stoffwechsels. Und die Bestimmung der spezifisch-dynamischen Wirkung ist auch deshalb von Wichtigkeit, weil wir dabei zugleich, allerdings auf indirektem Wege, Einsicht in den konstitutiven Teil des Stoffwechsels gewinnen.

Die gleiche Betrachtungsweise liefert uns auch einige Anhaltspunkte für das Verständnis der Tatsache, warum die Eiweißkörper höher spezifisch-dynamisch als die Kohlehydrate und die Fette wirken. Der Eiweißstoffwechsel der Zelle ist besonders fein abgestuft. Aus

den Stoffwechselversuchen von *Hopkins*, *O. Loewi*, *E. Abderhalden* u. a. wissen wir, daß die Verwertung von Aminosäuregemischen ganz von dem Gehalt an bestimmten Aminosäuren abhängt. Die einzelnen Aminosäuren können von der Zelle nur in bestimmten Proportionen verwertet werden. Ein Teil der Aminosäuren kann zwar nach der Desaminierung für die Kohlehydratsynthesen gebraucht werden, der Rest der Aminosäuren ist für die stofflichen Zwecke der Zellen unbrauchbar. Er wird oxydiert und wirkt dynamisch.

Ein Prototyp zu diesen Vorgängen stellt der Hungerstoffwechsel des Rheinlachses dar (*Miescher*), wo der Lachs aus den etwa 20 Aminosäuren seines Muskeleiweißes nur vier für den Aufbau der Keimdrüsen zurückbehält und die übrigen Aminosäuren auf oxydativem Wege abbaut[1]). Es dürften im Prinzip die gleichen Vorgänge bei jeder Verwertung der Eiweißkörper vorherrschen. Es gibt keinen reinen Aufbau- und keinen reinen Abbaustoffwechsel, sondern beide sind miteinander verflochten und voneinander abhängig. Die spezifisch-dynamische und die spezifisch-konstitutive Eiweißwirkung sind nur Teile ein und desselben lebenswichtigen Grundvorganges.

Bei der spezifisch-dynamischen Eiweißwirkung ist ferner zu berücksichtigen, daß der erwachsene Organismus nur ein sehr geringes Vermögen hat, Eiweiß anzusetzen. Nur bei überreichlicher Ernährung oder nach erschöpfenden Krankheiten können bestimmte Eiweißmengen zum Depot gebracht werden.

Die spezifisch-dynamische Eiweißwirkung ist mit der vermehrten Harnstoffsynthese nach Eiweißzufuhr eng verbunden. Die Erhöhung der Oxydationen und die Zunahme der Harnstoffbildung verlaufen ziemlich parallel. Bei normaler Nierenfunktion kann nicht selten die Größe der Harnstoffausscheidung ein ungefähres Maß der spezifisch-dynamischen Eiweißwirkung darstellen.

Bei der spezifisch-dynamischen *Kohlehydratwirkung* liegen die Verhältnisse etwas anders. Der Organismus hält bekanntlich Kohlehydrate viel besser als Eiweißkörper zurück. Dieses steht wohl in erster Linie mit der Glykogenbildung und mit der Umbildung von Kohlehydrat in Fett im Zusammenhang. Der Organismus ist ferner befähigt, verschiedene Kohlehydrate in Traubenzucker umzuwandeln und dann die Glucose auszunutzen. Eine Überführung der einen Aminosäure in die andere dürfte dagegen einen sehr seltenen Vorgang darstellen. Kommen nun Zuckerarten zur Resorption, so können sie an vielen Stellen im Organismus in Zellbestandteile umgewandelt werden. Auch hier regelt natürlich die Zelle ihren Bedarf und läßt jeden momentanen Überschuß, der die Prozesse hemmen könnte, durch Verbrennung

[1]) Vgl. *A. Kossel*, Die Naturwissenschaften 1922, Nr. 47.

beseitigen. Wir finden also auch bei den Kohlehydraten eine spezifisch-dynamische Wirkung, die quantitativ geringer ist als diejenige des Eiweißes.

Die spezifisch-dynamische Wirkung der *Fette* ist für die hier entwickelte Betrachtungsweise von einer prinzipiellen Bedeutung. Die Fette wirken entweder sehr wenig oder fast gar nicht spezifisch-dynamisch. Es ist aber bekannt, daß die Fette nach ihrer Resorption sehr leicht im Organismus abgelagert werden. Sogar fremdartige oder selbst jodierte Fette können zur Ablagerung kommen. Hier ist also, im Gegensatz zum Eiweiß, der konstitutive Teil des Stoffwechsels vorherrschend. Der oxydative Teil tritt vorerst ganz in den Hintergrund und die spezifisch-dynamische Wirkung ist gering. Das Fehlen bzw. der geringe Betrag der spezifisch-dynamischen Wirkung bei den Fetten beweist zugleich, daß die hydrolytischen Spaltungen bei der Verdauung oder bei der Restitution innerhalb oder jenseits der Darmwand die Stoffwechselerhöhungen nach Nahrungsaufnahme nicht erklären können, denn all diese Prozesse spielen sich auch bei der Fettverdauung und bei der Fettresorption ab.

Zugunsten der Auffassung der spezifisch-dynamischen Wirkung als einer Reizwirkung der Nahrungsstoffe kann der Umstand angeführt werden, daß es gelingt, auch durch andere Reizmittel die Kalorienproduktion zu steigern. Verfütterung oder intravenöse Injektion von Harnstoff führt zu einer Erhöhung des Stoffwechsels[1]). Intravenöse Injektion von Natriumchlorid[2]), von Natriumcarbonat, dann Einfuhr von Natrium-, Magnesium-, Kalium- und Calciumchlorid oder von Natrium-, Magnesium-, Kalium-, Calciumcarbonat[3]), Verfütterung von Ammoniaksalzen[4]) bewirkt eine Zunahme der Energieproduktion. Da diese Stoffe selbst nicht verbrennen, so kann die erhöhte Wärmebildung nur von einer vermehrten Zelloxydation herrühren. Bei all diesen Versuchen muß aber berücksichtigt werden, daß die Eingabe von größeren Salzmengen, besonders bei intravenöser Einfuhr, einen ziemlich starken Eingriff darstellt und eine ganz heftige Reaktion des Organismus zur Folge haben muß. Bestimmte, vielleicht nur kurzdauernde Zellschädigungen, sowie erhöhte Organleistungen (z. B. der Niere) zur Beseitigung der aufgezwungenen Störung sind sehr wahrscheinlich. Diese und ähnliche Prozesse können schon die vorübergehende Zunahme der Kalorienbildung zum Teil genügend erklären.

---

[1]) *N. Zuntz* und *Steck*, Med. Klinik 1910, Nr. 8/9; *Tangl*, diese Zeitschr. **34**, 1, 1911.

[2]) *C. Lehmann*, Tageblatt d. Nat. Vers. in Magdeburg 1884, S. 186.

[3]) *N. Zuntz*, Veröff. d. Zentralstelle f. Balneologie **2**, 1914.

[4]) *E. Grafe*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **118**, 1, 1915.

Auch kurz nach der Eingabe ganz geringer Mengen von Adrenalin, Pilocarpin, Atropin[1]) sieht man sehr hohe Zunahme des Gaswechsels. Diese und ähnliche Prozesse lassen sich aber mit den *physiologischen Vorgängen*, die sich nach Nahrungsaufnahme abspielen, nicht vergleichen.

Über einige Faktoren, welche die spezifisch-dynamische Wirkung beeinflussen.

Wir haben bis jetzt *einen* Faktor der spezifisch-dynamischen Wirkung, nämlich die qualitative Beschaffenheit des Nahrungsstoffes, den Grad seiner Verwertbarkeit für die Zellsynthesen und für die Zellablagerung sowie seine Oxydierbarkeit besprochen. Da es sich bei der spezifisch-dynamischen Wirkung um eine Wechselbeziehung zwischen der Zelle und dem Nährstoff handelt, so ist es ohne weiteres klar, daß auch der Zustand der Zelle die Größe der spezifisch-dynamischen Wirkung beeinflussen muß. Dieser Zustand der Zelle, d. h. der Grad ihrer Fähigkeit, den Stoff zu behalten oder zu oxydieren, wechselt fortwährend. Schon daraus muß mit logischer Notwendigkeit folgen, daß die spezifisch-dynamische Wirkung keine konstante Größe darstellen kann. Tatsächlich findet man in langdauernden Versuchen selbst beim gleichen Individuum innerhalb relativ kurzer Zeit Schwankungen der spezifisch-dynamischen Wirkung. Um so mehr muß sich die Bedeutung des Zellzustandes geltend machen, wenn die Bedingungen nicht mehr normal physiologisch sind. Jeder Eingriff, der das Zellleben verändert, muß auch eine Änderung der spezifisch-dynamischen Wirkung zur Folge haben. Und umgekehrt, jede beträchtliche Abweichung der spezifisch-dynamischen Wirkung deutet auf eine veränderte Zelltätigkeit hin, die aber nicht immer als pathologisch bezeichnet werden muß.

Veränderungen im Haushalt der Zelle können durch alle möglichen Faktoren erzeugt werden. Ein Faktor, der die gesamten Stoffwechselprozesse und somit auch die spezifisch-dynamische Wirkung mächtig beeinflußt, ist die Verfütterung von wirksamer Schilddrüsensubstanz[2]). Auch die Eingabe von proteinogenen Aminen, wie Phenyläthylamin und Tyramin, oder Adrenalin wirken in ähnlichem Sinne. Beim Tiere z. B. (bei der Ratte) ruft die Aufnahme selbst geringer Mengen von Thyreoideastoffen eine Verdopplung bis Verdreifachung der spezifisch-dynamischen Wirkung des Fleisches oder der Kohlehydrate hervor. Klingt die Schilddrüsenwirkung ab, so kehrt die spezifisch-dynamische Wirkung allmählich zur Norm zurück, nimmt aber dabei einen ganz eigentümlichen Verlauf an. Es kommt häufig vor, daß selbst nach dem Aufhören der Schilddrüsenzufuhr, wo der Ruheumsatz bereits wieder

[1]) Vgl. *J. Abelin*, diese Zeitschr. **129**, 1, 1922.

[2]) *J. Abelin*, diese Zeitschr. **137**, 273; *K. Miyazaki* und *J. Abelin*, ebendaselbst **149**, 109; *J. Abelin*, Klin. Wochenschr. 1922 und 1923.

fast normale Werte erreicht hat, die spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches sehr hoch ausfällt. Darauf bildet sich ein Stadium aus, wo die spezifisch-dynamische Wirkung fast vollkommen fehlt. Es ist in diesem Zusammenhang der Hinweis von Interesse, daß man bei manchen konsumierenden Krankheiten, z. B. bei Typhus, in den ersten Stadien der Rekonvaleszenz bei der Nahrungszufuhr ganz besonders hohe Werte für die spezifisch-dynamische Wirkung findet. Mit dem Fortschreiten der Rekonvaleszenz nähern sich die Zahlen der spezifisch-dynamischen Wirkung allmählich der Norm, um häufig sogar subnormal zu werden[1]). Also sehr ähnlich wie nach Schilddrüsenzufuhr. In solchen Fällen läßt sich also innerhalb eines relativ kurzen Zeitintervalls die Bedeutung des Zustandes der Zelle für die spezifisch-dynamische Wirkung sehr gut verfolgen. Es drängt sich hier eine ganze Reihe von Fragen auf. Wie soll man sich die Zunahme der spezifisch-dynamischen Wirkung bei der Schilddrüsenzufuhr erklären? Warum bleibt die spezifisch-dynamische Wirkung noch hoch, wenn die Schilddrüsenzufuhr bereits aufgehört hat? Warum findet man häufig nach einer solchen Schilddrüsenperiode oder nach schweren Erkrankungen ein Absinken der spezifisch-dynamischen Wirkung auf ganz niedrige Werte, nicht selten sogar bis auf Null?

Bei der Eingabe von Schilddrüsenstoffen (und wahrscheinlich auch bei vielen menschlichen Krankheiten, die von einer Änderung des Stoffwechsels begleitet werden) müssen wir in erster Linie an eine Schädigung der Körperzellen denken. Diese Schädigung, die vielleicht morphologisch gar nicht faßbar ist und vielleicht nur die feinsten zellulären Strukturverhältnisse betrifft, verursacht natürlich eine Veränderung im Stoffwechsel der Zelle. Die normale Ernährung der Zelle, ihr Restitutionsvermögen, ihre Fähigkeit, Reservestoffe abzulagern und zu behalten, wird geschädigt. Die Reservestoffe, wie Glykogen, Depoteiweiß oder Fett werden angegriffen. Tatsächlich findet man nach Schilddrüsenfütterung einen Glykogenschwund aus der Leber sowie eine erhebliche Eiweiß- und Fettmobilisation. *Es kommt zu einem erhöhten Stoffangebot.* Auch hier erweist sich dann die Verbrennung als ein Hilfsmittel, um unverwertbare Stoffe von der Zellumgebung zu entfernen. Das Aufhören der Schilddrüsenzufuhr kann neue Zellschädigungen verhüten, kann aber die bereits bestehenden nicht wieder gutmachen. Solange diese Zellstörung da ist, wird also die Nahrung keine richtige Ausnutzung finden können und so lange wird somit immer noch die erhöhte Oxydation den Ausweg darstellen. Daher die hohe spezifisch-dynamische Wirkung auch nach dem Aufhören der Schilddrüseneingabe. Ist aber die Zellschädigung in das Reparations-

[1]) Vgl. *Svenson*, Zeitschr. f. klin. Med. **43**, 86, 1901.

stadium übergegangen, so wird sich dann der konstitutive Stoffwechsel erst recht geltend machen und die spezifisch-dynamische Wirkung wird kleiner werden. Die *qualitative* Störung des Zellstoffwechsels wäre also das Primäre. Die *quantitative* Veränderung der oxydativen Vorgänge und die Zunahme der spezifisch-dynamischen Wirkung wären also nur Folgen dieser Zellschädigung.

In anderen Fällen kann die Zellschädigung hauptsächlich den Oxydationsstoffwechsel betreffen. Das Gleichgewicht zwischen dem konstitutiven und dem dynamischen Stoffwechsel kann manchmal auch zugunsten des ersteren verschoben werden. Unter diesen Bedingungen wäre eine Herabsetzung der spezifisch-dynamischen Wirkung wahrscheinlich. Ob solche Fälle in der Pathologie bekannt sind, ist schwer zu entscheiden (vgl. *R. Plaut*, *P. Liebesny*).

Von den *physiologischen* Faktoren, welche die spezifisch-dynamische Wirkung beeinflussen, verdienen das Wachstum und die Schwangerschaft ein besonderes Interesse. *Rubner* und *Heubner*[1]) haben bei Säuglingen eine Verminderung der spezifisch-dynamischen Eiweißwirkung beobachtet. Die Angaben über das Verhalten der spezifisch-dynamischen Wirkung während der Schwangerschaft sind nicht ganz übereinstimmend, allerdings ist auch die Zahl der untersuchten Fälle sehr gering. *Knipping*[2]) fand eine Verminderung der spezifisch-dynamischen Wirkung während der Schwangerschaft. *G. Haselhorst* und *R. Plaut*[3]) sahen dagegen bei Schwangeren keine Abweichungen der spezifisch-dynamischen Wirkung von der Norm. — In neueren Versuchen hat *K. Nakayama*[4]) gefunden, daß eine eisenarme Ernährung bei einem Hunde ohne Milz eine Herabsetzung der spezifisch-dynamischen Fleischwirkung verursacht.

Über das Fehlen der spezifisch-dynamischen Wirkung.

Die spezifisch-dynamische Wirkung tritt besonders in den ersten Stunden nach der Nahrungsaufnahme in Erscheinung. Bei jeder Bestimmung der spezifisch-dynamischen Wirkung muß daher neben der Menge und der Qualität der Nahrung auch der Zeitfaktor berücksichtigt werden, d. h. die Anzahl Stunden, die seit der Nahrungsaufnahme verstrichen ist. Wir bestimmen bei der spezifisch-dynamischen Wirkung in gewissem Sinne die „Reaktionsgeschwindigkeit“, d. h. die Schnelligkeit, mit welcher die Zellen das ihnen dargebotene Nährmaterial chemisch verarbeiten. Zwischen einer sehr schnellen und einer sehr langsamen Steigerung der Oxydationen nach Nahrungsaufnahme sind

[1]) *Rubner* und *Heubner*, Zeitschr. f. Biol. **38**, 315, 1899.
[2]) *Knipping*, Arch. f. Gynäk. **116**, 1923.
[3]) *G. Haselhorst* und *R. Plaut*, Klin. Wochenschr. 1924, S. 1708.
[4]) *K. Nakayama*, diese Zeitschr. **151**, 1924.

alle möglichen Übergänge denkbar. *Einer besonders sorgfältigen Kontrolle bedürfen diejenigen Versuche, welche ein Fehlen der spezifisch-dynamischen Wirkung ergeben.* Zwar sind solche Fälle bekannt. Sie treten z. B. hier und da bei sehr starker Aufbautendenz des Organismus auf. Auch bei einer Störung des Oxydationsstoffwechsels wäre ein Ausbleiben der spezifisch-dynamischen Wirkung denkbar. Doch muß bei einem länger dauernden Fehlen der spezifisch-dynamischen Wirkung eine Körpergewichtszunahme stattfinden. Aber selbst unter dieser Voraussetzung kann es sich natürlich nicht um einen Dauerzustand handeln.

Ein Ausbleiben der spezifisch-dynamischen Wirkung kann durch eine geringe Reaktionsgeschwindigkeit vorgetäuscht werden, d. h. die Zunahme des Stoffwechsels nach der Nahrungsaufnahme verteilt sich auf längere Zeit als normal und ist daher in jeder Stunde nicht sehr bedeutend. In solchen Fällen müssen häufige Kontrollen in verschiedenen Zeitabständen nach der Nahrungsaufnahme vorgenommen werden.

Ein Fehlen der spezifisch-dynamischen Wirkung kann auch darauf beruhen, daß die Resorption der Verdauungsprodukte verlangsamt ist. Eine Herabsetzung der spezifisch-dynamischen Wirkung kann ferner auch dann eintreten, wenn der Abbau der Nahrungsstoffe atypisch verläuft und wenn die Oxydation nicht bis zu den Endprodukten führt, sondern an gewissen Zwischenstufen stehen bleibt. Dann dürften aber im Harn pathologische Bestandteile auftreten. Jedenfalls bedürfen die Fragen des Ausbleibens der spezifisch-dynamischen Wirkung einer sehr eingehenden Bearbeitung. In solchen Fällen kann nur die summarische Gaswechselbestimmung während einer längeren Zeit, z. B. 24 Stunden, Auskunft geben. Solche langdauernde Versuche wurden bekanntlich von *Rubner* bei seinen Studien über die spezifisch-dynamische Wirkung ausgeführt.

Über die spezifisch-dynamische Wirkung des nucleinsauren Natriums.

Ein Stoff wird keine oder nur eine sehr geringe spezifisch-dynamische Wirkung haben, wenn er entweder von der Zelle schwer angegriffen wird oder wenn er sehr leicht Zellbestandteil werden kann. Es gibt nun eine Reihe von Mono-, Diaminosäuren, sowie von Eiweißverbindungen, denen eine besonders wichtige *stoffliche* Bedeutung zukommt und die zum großen Teil in anderer, nicht oxydativer Weise vom Organismus ausgenutzt werden. *Solche* Verbindungen dürfen dann nach den oben entwickelten Anschauungen nicht oder nur sehr wenig spezifisch-dynamisch wirken. Um diese Frage zu prüfen, habe ich *die spezifisch-dynamische Wirkung von nucleinsaurem Natrium* studiert.

Geplant sind ferner Versuche mit *Histonen und Protaminen*. All diese Verbindungen stehen in inniger Beziehung zum Zelleben und könnten deshalb erst recht als Zellreize dienen.

Der Gang der Versuche war der übliche, d. h. nach Ausschaltung der chemischen Wärmeregulation wurde bei einer Außentemperatur von 28° der sogenannte Erhaltungsumsatz der Ratten bestimmt. Dann wurde den Tieren das Natrium nucleinicum per os eingeführt, $1/2$ bis 1 Stunde darauf kamen die Tiere wieder in den Versuchskasten und blieben darin etwa 5 Stunden. Wie die Tabelle I und II zeigen, hat das nucleinsaure Natrium (aus Hefe) keine Steigerung der Oxydationen ausgelöst. Vergleicht man in Tabelle I die Mittelwerte der Nüchternversuche mit den Mittelwerten nach Zufuhr von Natrium nucleinicum, so findet man, daß letztere Zahlen sogar unter den Nüchternwerten liegen. Es ist allerdings zu berücksichtigen, daß wir am 8. August eine besonders niedrige Wärmeproduktion haben, und zwar aus dem Grunde, weil der respiratorische Quotient nach der Eingabe von Natrium nucleinicum ziemlich in die Höhe ging und den Wert von 0,878 erreicht hat. Dies ist nicht die Regel beim nucleinsauren Natrium, man findet aber hie und da eine Erhöhung des Respirationsquotienten, die vielleicht auf die Oxydation des im nucleinsauren Natrium enthaltenen Zuckers zurückzuführen ist. Sieht man aber vom Werte des Versuchs 1263 vom 8. August ab, so ergeben auch die anderen Zahlen keine Gaswechselzunahme nach Zufuhr von Natrium nucleinicum. An diesem Befunde ändert auch die Fütterung mit Schilddrüsensubstanz nichts. Eine viermalige Darreichung von je 20 mg Schilddrüse hat zwar den Gaswechsel um rund 20 Proz. erhöht, die spezifisch-dynamische Wirkung des nucleinsauren Natriums ist darauf in dem einen Versuch gleich Null, in dem anderen Versuch beträgt sie 8,2 Proz., eine Zahl, die noch innerhalb der normalen Schwankungen des Gaswechsels liegt.

Tabelle II umfaßt die Versuche an zwei anderen Tieren. Auch hier war sowohl vor als auch nach der Schilddrüsendarreichung keine spezifisch-dynamische Wirkung des Natrium nucleinicum festzustellen. Die Mittelwerte der Nüchternzahlen und diejenigen nach Zufuhr von nucleinsaurem Natrium weichen nur sehr wenig voneinander ab. Die Kalorienproduktion pro Kilogramm und Stunde beträgt im Nüchternzustande im Durchschnitt 5,68, nach nucleinsaurem Natrium 5,83 Kalorien. In den Versuchen 1278 bis 1283 finden wir als Mittelwert des Erhaltungsumsatzes 6,85 Kalorien pro Kilogramm und Stunde, der Mittelwert nach Zufuhr von nucleinsaurem Natrium beträgt 6,43 Kalorien. Die geringe Erniedrigung des Wertes rührt auch hier hauptsächlich von einer Erhöhung des Respirationsquotienten im Versuche 1282 her.

Die Versuche zeigen eindeutig, daß von einer spezifisch-dynamischen Wirkung des nucleinsauren Natriums nicht gesprochen werden kann. Diese Schlußfolgerung steht in vollem Einklang mit den soeben von *M. Ringer* und *D. Rapport*[1]) (bei *G. Lusk*) veröffentlichten Versuchen, in denen ebenfalls keine spezifisch-dynamische Wirkung von Hefe- und Thymusnucleinsäure festgestellt werden konnte.

---

[1]) *M. Ringer* und *D. Rapport*, Journ. of biol. Chem. 58, 481, 1924.

Tabelle

Nr.	Datum 1924	Präparat Beginn des Versuchs	H_2O-Bildung g
1259	29. VII.	Nüchtern	1,35
1260	31. VII.	„	1,52
1261	4. VIII.	„	0,68
1262	6. VIII.	3/4 Std. nach Aufnahme von 1 g Na nucleinic. per os	0,63
1263	8. VIII.	1/2 „ „ „ „ 1,3 g „ „ „	1,05
1264	11. VIII.	1/2 „ „ „ „ 1 g „ „ „	1,44
	14. VIII.	20 mg Thyroid Gland Wellcome	—
	15. VIII.	20 mg „ „ „	—
	16. VIII.	20 mg „ „ „	—
	18. VIII.	20 mg „ „ „	—
1265	19. VIII.	Nüchtern	1,14
1266	19. VIII.	1/2 Std. nach Aufnahme von 1 g Na nucleinic. per os	1,50
1267	20. VIII.	20 mg Thyroid Gland Wellcome per os	—
1268	21. VIII.	Nüchtern	0,47
1269	21. VIII.	1/2 Std. nach Aufnahme von 1 g Na nucleinic. per os	1,14

Tabelle

Nr.	Datum 1924	Präparat Beginn des Versuchs	H_2O-Bildung g
1270	30. VII.	Nüchtern	1,74
1271	1. VIII.	„	1,24
1272	5. VIII.	„	1,41
1273	15. VIII.	„	1,42
1274	20. VIII.	1 Std. nach Aufnahme von 1 g Na nucleinic. per os	0,94
1275	22. VIII.	1 „ „ „ „ 1 g „ „ „	1,12
	25. VIII.	20 mg Thyroid Gland Wellcome per os	—
	26. VIII.	20 mg „ „ „ „ „	—
1276	27. VIII.	Nüchtern	1,12
1277	27. VIII.	1/2 Std. nach Aufnahme von 1 g Na nucleinic. per os	1,06
1278	29. VII.	Nüchtern	1,49
1279	31. VII.	„	1,91
1280	4. VIII.	„	1,85
1281	6. VIII.	3/4 Std. nach Aufnahme von 1 g Na nucleinic. per os	0,97
1282	8. VIII.	1/2 „ „ „ „ 1,3 g „ „ „	1,29
1283	11. VIII.	1/2 „ „ „ „ 1 g „ „ „	1,00

I.

CO_2-Bildung	O_2-Aufnahme	Respirations-quotient	CO_2	O_2	Kalorien-bildung	CO_2	O_2	Kalorien-bildung	Gewicht der Ratte	Dauer des Versuches	Temperatur des Kastens
			pro Kilo und Stunde			pro Kilo und Stunde im Mittel während der einzelnen Perioden					
g	g		g	g		g	g		g	Std.	°C
1,64	1,58	0,754	1,79	1,73	5,83				159,2	5,75	27—28
2,15	2,02	0,773	1,96	1,84	6,23				156,9	7	28—29
1,81	1,69	0,777	1,88	1,75	5,96	1,88	1,77	6,01	160,4	6	28
0,99	0,90	0,799	1,80	1,63	5,57				157,6	3,5	28—29
1,39	1,15	0,878	1,72	1,43	4,94				161,4	5	28—29
1,66	1,48	0,815	2,06	1,84	6,29				160,8	5	29
						1,86	1,63	5,60			
—	—	—	—	—	—				—	—	—
—	—	—	—	—	—				—	—	—
—	—	—	—	—	—				—	—	—
—	—	—	—	—	—				—	—	—
1,22	1,15	0,770	2,24	2,12	7,18				181,1	3	28
2,05	1,93	0,771	2,26	2,13	7,22				181,4	5	28—29
—	—	—	—	—	—				—	—	—
1,00	0,94	0,773	2,18	2,05	7,13				183,1	2,5	27—28
2,20	2,09	0,761	2,39	2,28	7,72				184,1	5	28—29

II.

CO_2-Bildung	O_2-Aufnahme	Respirations-quotient	CO_2	O_2	Kalorien-bildung	CO_2	O_2	Kalorien-bildung	Gewicht der Ratte	Dauer des Versuches	Temperatur des Kastens
			pro Kilo und Stunde			pro Kilo und Stunde im Mittel während der einzelnen Perioden					
g	g		g	g		g	g		g	Std.	°C
1,94	1,88	0,750	1,78	1,72	5,82				181,9	6	28
1,57	1,46	0,781	1,68	1,56	5,31				186,9	5	28
2,15	1,98	0,803	1,95	1,79	6,11				200,9	5,5	28
1,86	1,76	0,768	1,70	1,61	5,47	1,75	1,67	5,68	198,6	5,5	27
1,98	1,82	0,790	1,78	1,64	5,59				221,90	5	28
2,30	2,20	0,761	1,87	1,79	6,07				223,10	5,5	28
						1,82	1,72	5,83			
—	—	—	—	—	—				—	—	—
—	—	—	—	—	—				—	—	—
1,35	1,31	0,749	2,10	2,04	6,88				214,60	3	28—29
2,28	2,19	0,774	2,13	2,04	6,94				214,0	5	28
1,51	1,47	0,746	1,99	1,93	6,53				138,3	5,5	27—28
2,05	1,96	0,760	2,14	2,04	6,92				137,0	7	28—29
1,86	1,81	0,746	2,16	2,10	7,10	2,10	2,01	6,85	143,4	6	28
1,02	0,95	0,780	2,00	1,86	6,32				146,0	3,5	28—29
1,43	1,29	0,805	1,91	1,73	5,88				149,7	5	28—29
1,69	1,60	0,767	2,17	2,06	6,99	2,03	1,88	6,43	155,5	5	29

Das Wesen der spezifisch-dynamischen Wirkung wird erst dann besser abgeklärt werden können, wenn einmal genauere Kenntnisse über den Chemismus des Zellstoffwechsels vorliegen. Solange uns diese Einsicht fehlt, müssen wir uns verschiedener Hypothesen bedienen, die den Tatsachen mehr oder weniger gerecht zu werden suchen. Legen wir der Betrachtung die oben entwickelten Überlegungen zugrunde, so erscheint uns die spezifisch-dynamische Wirkung der Nahrungsstoffe weniger als eine Reizwirkung völlig unbekannter Reize, deren Bedeutung ganz unklar ist, sondern vielmehr als ein Vorgang, der mit dem Stoffwechsel und mit den Bedürfnissen der Zelle eng verknüpft ist. Die spezifisch-dynamische Wirkung stellt eines der Hilfs- und Regulationsmittel dar, derer sich der Organismus bedient, um die Zellen vor einem zu großen Stoffangebot und somit vor einer Schädigung zu schützen. Die dabei entwickelte Wärme ist zwar normalerweise für den Organismus überflüssig, der Prozeß selbst hat aber seine große biologische Bedeutung.

Über die chemische Beeinflussung des Augendrucks durch Magnesium.

Von

Toshiro Kaneko.

(Aus der experimentell-physiologischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für Arbeitsphysiologie.)

(Eingegangen am 31. Oktober 1924.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Im Jahre 1920 konnte *Römer*[1]) zeigen, daß nach dem Einbringen von Magnesiummetall in die vordere Kammer der intraokulare Druck des Kaninchenauges sinkt. Trotzdem *Römer* selbst zu einer physikalisch-chemischen Bearbeitung dieses Themas aufforderte, ist bisher noch keine Untersuchung über diesen Gegenstand erschienen. Ich nahm daher auf Veranlassung von Prof. *Atzler* die Bearbeitung dieser Frage in Angriff.

Zur Methodik.

Die Untersuchungen wurden an Säugetieren, größtenteils an Hunden, durchgeführt. Zur Messung des Augendrucks verwandte ich je nach der Art des Versuchs das *Schiötz*sche Tonometer oder aber, wenn es angängig war, ein Manometer, das exaktere Zahlen, als sie die Tonometrie liefert, angibt. Das verwendete Manometer ist bereits vor einigen Jahren von Prof. *Atzler* konstruiert worden, eine Beschreibung ist aber bisher noch nicht erfolgt.

Das Prinzip dieses Manometers beruht auf der Hintereinanderschaltung eines Quecksilber- und eines Wassermanometers. In der Skizze (Abb. 1) bedeutet M_1 das zweischenklige Quecksilbermanometer, dessen Schenkel eine Höhe von 12 cm haben; es ist auf einer mit durchgehenden Millimeterstrichen versehenen Spiegelplatte befestigt. Mit dem Schenkel *b* dieses Manometers ist ein etwa 1 m langer dickwandiger Gummischlauch verbunden, der in einem 30 cm langen Glasrohr *G* von 1 cm Kaliber endigt. Dieses auf einer Skala verschieblich angeordnete Glasrohr *G* bildet das Wassermanometer M_2. Die Skala ist so gezeichnet, daß ein Teilstrich einem Druck von 1 mm Quecksilber entspricht. Am Schenkel *a* des Quecksilbermanometers ist ein kleiner Trichter angebracht, der dazu dient, den

[1]) *Römer*, Ber. d. D. ophthalmol. Ges. Heidelberg, 1920, S. 55.

Glasansatz und den damit verbundenen dünnen Druckschlauch mit Salzlösung zu füllen. Am Ende des kurzen Druckschlauches befindet sich eine Metallkanüle *K*, die in die vordere Kammer eingestochen wird.

Befindet sich diese Kanüle in der Höhe, um die die beiden Quecksilbermenisken spielen, so werden diese Menisken dann auf gleicher Höhe stehen, wenn das Wassermanometer so weit gesenkt wird, daß auch sein Meniskus in der gleichen Höhe liegt. Wird nun in der gleichen Höhe die Kanüle in die vordere Kammer eines Auges eingestoßen, so tritt etwas Kammerwasser in die Kanüle über und verschiebt die Quecksilbermenisken. Hebt man das Wassermanometer so weit, bis die Quecksilbermenisken wieder auf

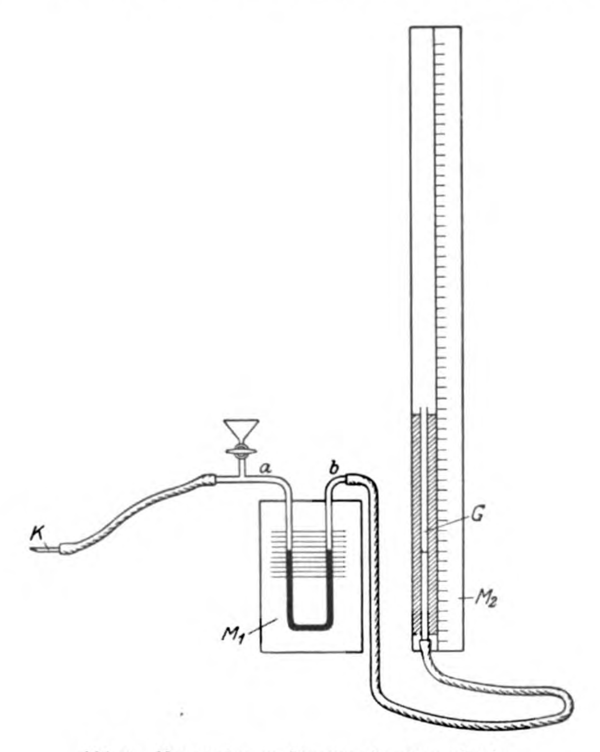


Abb. 1. Manometer zur Messung des Augendrucks.

gleiche Höhen gebracht sind, so wird das ausgetretene Kammerwasser sofort wieder zurückgepreßt; damit wird im Auge der normale Druck wieder hergestellt. Da das Hg-Manometer ja auf 0 steht, entspricht die Wassersäule von der Höhe der Quecksilbermenisken aus gerechnet dem intraokularen Druck. Jede Druckänderung im Auge macht sich nun in einer kleinen Verschiebung der Hg-Menisken geltend, die sofort durch entsprechende Korrektur der Stellung des Wassermanometers wieder ausgeglichen wird.

Das Manometer gestattet eine über mehrere Stunden fortgesetzte Messung des mittleren Augendrucks. Es hat den Vorteil großer Einfachheit und exakten Arbeitens. Zur Wiedergabe der pulsatorischen Schwankungen

ist es im Gegensatz zu dem von *Wessely*[1]) wegen der großen Massen, die bei einer Druckänderung bewegt werden müssen, nicht geeignet.

Bei einfachen Druckmessungen bedient man sich einer Metallkanüle (sogenannte *Leber*sche Kanüle) mit einer seitlichen Öffnung, deren verschlossene Spitze auf der Gegenseite nahe dem Limbus durch die Cornea gestoßen wird. So ist eine sichere Lage der Nadel garantiert. Handelte es sich aber darum, in die vordere Kammer eine Flüssigkeit, deren Einwirkung auf den Druck festgestellt werden soll, einzubringen, so verwandten wir die in Abb. 2 wiedergegebene Kanüle mit offener Spitze, zwei seitlichen Öffnungen und einer (in der Skizze nicht sichtbaren) Querwand zwischen diesen beiden Öffnungen.



Abb. 2. Nadel zur Druckmessung.

Zur Durchspülung des Auges bekam diese Kanüle die Lage, die der ausgezogene Kreisbogen, der die Cornea darstellen soll, wiedergibt. Mit Hilfe des kleinen, auf dem Manometer angebrachten Trichters lief die Flüssigkeit in die Kanüle ein, aus der ersten Öffnung in die vordere Kammer, von dieser durch die zweite Öffnung in die Kanüle zurück, um schließlich aus der Spitze der Kanüle nach außen abzufließen. Sollte nach der Durchspülung der Druck gemessen werden, so wurde die Kanüle so weit vorgeschoben, daß die Cornea die gestrichelt gezeichnete Lage einnahm. Damit waren die gleichen Verhältnisse geschaffen, wie bei der einfachen Druckmessung.

Wir fanden nach dieser Methode als durchschnittlichen Druck bei 12 normalen Kaninchenaugen 24,0 (19,0 bis 31,8) mm Hg, bei 40 Hundeaugen 23,7 (19,3 bis 33,5) mm Hg; bei Messungen mit dem *Schiötz*schen Tonometer dagegen bei 44 Kaninchenaugen 23,9 (18 bis 30) und bei 24 Hundeaugen 25,5 (18,0 bis 34,0) mm Hg.

Manometrische und tonometrische Versuche.

Wir bestätigten zunächst die Angaben von *Römer*[2]), daß Magnesiummetall in der vorderen Kammer stets eine Senkung des Augendrucks hervorruft. So sank z. B. der Druck in Katzenaugen bei dieser Behandlung von 33 mm Hg (*Schiötz*) auf 18 oder 16 innerhalb 1 bis 2 Tagen, während der Druck in den Kontrollaugen unverändert blieb.

Bereits *Römer* hatte die Frage aufgeworfen, ob es sich bei dieser Erscheinung um eine Wirkung der Mg-Ionen oder um einen Einfluß der erhöhten Alkaleszenz handelt. Um zunächst die Frage zu klären, welche Alkaleszenz dabei erreicht werden kann, brachten wir pulverisiertes Magnesium in Plasma, ließen es 1 bis 2 Tage stehen und maßen dann mit der Gaskette die Wasserstoffionenkonzentration. Das p_H dieses Plasmas lag ausnahmslos weit über 8, gelegentlich nahe an 9.

[1]) *Wessely*, Experimentelle Untersuchungen über den Augendruck. Wiesbaden 1908.

[2]) *Römer*, l. c.

Infolge des dauernden Flüssigkeitswechsels werden derartig hohe Werte im Auge natürlich nicht erreicht, würden vor allem auch nicht reizlos vertragen werden.

Es war daher notwendig, Messungen der Wasserstoffionenkonzentration im Kammerwasser normaler und mit Mg vorbehandelter Augen auszuführen. Wir bedienten uns hierbei der *Michaelis*schen Indikatorenmethode in der für das Kammerwasser geeigneten Form, wie sie *Meesmann*[1]) im hiesigen Institut ausgearbeitet hat. Die Versuche wurden am Hunde durchgeführt, dessen normales Kammerwasser im Durchschnitt ein p_H von 7,65 hatte. Am Tage nach der Einbringung des Magnesiums war der Druck von 30 auf etwa die Hälfte gesunken, und das p_H betrug 7,9 bis 8,1. Es war also in der Tat mit der Drucksenkung eine beträchtliche Erhöhung der Alkaleszenz eingetreten. Dieser Befund ist insofern auffällig, als *Meesmann* zeigen konnte, daß sonst gerade umgekehrt der Augendruck bei Erhöhung der Alkaleszenz steigt. *Meesmann* konnte sogar bei Druckmessungen und gleichzeitiger p_H-Bestimmung am Menschen zeigen, daß durchaus gesetzmäßig sich die hohen p_H-Werte dem hohen Druck zuordnen. Aber auch im Tierexperiment gelang es diesem Autor, durch Injektion alkalischer Pufferlösung ausnahmslos Drucksteigerungen, durch Injektion saurer Lösungen Drucksenkung zu erzielen. *Meesmann* erklärt diesen Befund durch Quellungserscheinungen, eine Erklärung, die durch neue Untersuchungen von *Baurmann*[2]) über die Quellbarkeit des Glaskörpers sehr an Wahrscheinlichkeit gewonnen hat.

Mit der Tatsache der Drucksenkung bei Einbringung von Magnesium stehen diese Beobachtungen in einem auffallenden Gegensatz, so daß es uns geboten schien, die Resultate, die *Meesmann* bei Einbringung isotonischer Pufferlösungen erhielt, nachzuprüfen. Das Ergebnis dieser Versuche war eine völlige Bestätigung der *Meesmann*schen Angaben. Auch wir konnten bei erhöhter Alkaleszenz stets nur Drucksteigerung beobachten.

Damit ist der Beweis erbracht, daß die Magnesiumwirkung sicher nicht auf eine OH-Ionenwirkung zurückgeführt werden kann. Damit ist aber weiterhin recht unwahrscheinlich geworden, daß die Magnesiumwirkung überhaupt als eine Kolloidquellungs- oder Entquellungsreaktion aufzufassen ist, denn die Einwirkung der H- oder OH-Ionen auf die Quellung amphoterer Elektrolyte ist ausnahmslos sehr viel größer als die der Kationen. Es ist von vornherein unwahrscheinlich, daß ein quellungshemmender Einfluß der Magnesiumionen so stark sein kann, daß er dem quellungsfördernden der OH-Ionenvermehrung überwiegt.

---

[1]) *A. Meesmann*, Arch. f. Augenheilkunde **94**, 115, 1924.
[2]) *M. Baurmann*, Arch. f. Ophtalmologie **114**, 276, 1924.

Die starke Einwirkung des Magnesiums auf den Augendruck muß somit aller Wahrscheinlichkeit nach auf eine direkte biologische Wirkung des Magnesiums auf einen Mechanismus, der für die Erhaltung der normalen Tension wichtig ist, zurückzuführen sein. Um dieser Frage näher zu kommen, schien es in erster Linie geboten, zu untersuchen, ob mit anderen Kationen ähnliche Wirkungen erzielt werden können und welche Magnesiumkonzentrationen im Kammerwasser tatsächlich auftreten müssen, um die Drucksenkung hervorzurufen.

Die Bedingung der Einbringung des Metalls selbst in die vordere Kammer, wie es bei Magnesium möglich ist, läßt sich bei den meisten dem Magnesium chemisch näher stehenden Kationen nicht erfüllen. Die einzige Ausnahme bildet das Aluminium. Das Einlegen eines Stückchens dieses Metalles in die vordere Kammer hatte keine Änderung des Druckes zur Folge. Damit ist zugleich gesagt, daß die Drucksenkung durch das Magnesiummetall nicht auf irgendwelchen mechanischen Reizwirkungen beruhen kann.

Um die Untersuchungen auf andere Metalle auszudehnen, war es geboten, an Stelle der Metalle selbst ihre Salze in das Auge zu bringen. Wir verglichen aus diesem Grunde Kalium, Calcium und Magnesiumchlorid. Diese Untersuchungen gestalteten sich insofern etwas schwieriger, als die einmalige Injektion in die vordere Kammer nur eine relativ sehr kleine Flüssigkeitsmenge in das Auge bringen kann. Sind aber diese geringen Mengen, die das Auge schnell wieder verlassen, unwirksam, so ist damit über Dauerwirkungen noch nichts gesagt.

Beim Einbringen einer Salzlösung in das Augeninnere hat man streng darauf zu achten, daß die Lösung dem Kammerwasser genau isotonisch ist. Bei allen Salzen ändert die geringste Abweichung von der Isotonie den okularen Druck. Für diese Untersuchungen verwandten wir vorzugsweise das *Atzler*sche Manometer, das eingangs beschrieben wurde.

Es zeigte sich, daß bei Verwendung isotonischer Natrium-, Kalium- Calcium- und Magnesiumchloridlösungen selbst bei dieser Versuchsanordnung, wo zum mindesten ein Ersatz der gesamten Vorderkammerflüssigkeit durch die betreffende Lösung erreicht wird, die okulare Tension bei allen einwandfreien Versuchen sich nicht änderte.

Daß Magnesiumchlorid umwirksam ist, ist auffallend. Die wahrscheinlichste Erklärung dürfte sein, daß bei dieser Anordnung zwar in der vorderen Kammer eine hohe Konzentration von Magnesium besteht, daß es aber in den tieferliegenden Teilen des Auges nicht genügend stark konzentriert ist, um wirksam zu sein. Das prinzipiell Wichtige bei der Wirkung des metallischen Magnesiums liegt demnach nicht in der hohen Konzentration von Mg-Ionen im Kammerwasser, sondern in der immerwährenden Neubildung und dem Nachdringen von

Magnesium in die tiefer liegenden Teile des Auges. Wir erhalten einen Fingerzeig dafür, daß der Angriffspunkt des Magnesiums jedenfalls nicht im vorderen Teile des Auges zu suchen ist.

Um dem Einwurf zu begegnen, daß gerade bei der Auflösung metallischen Magnesiums im Kammerwasser spezifisch wirkende Stoffe durch Reaktion mit normalen Bestandteilen des Kammerwassers entstehen könnten, die sich bei der Einspritzung von $MgCl_2$ nicht bilden, brachten wir pulverisiertes Magnesium in Plasma, ließen die Mischung 1 bis 3 Tage im Eisschrank stehen und machten sie durch Ultrafiltration eiweißfrei. Auch mit dieser Flüssigkeit, die zweifellos in ihrer Zusammensetzung dem Kammerwasser eines mit Magnesium behandelten Auges außerordentlich ähnlich ist, ließ sich keine Druckherabsetzung erzielen. Dieses Resultat bestärkte uns sehr in der ausgesprochenen Ansicht, daß das wesentliche Moment darin zu sehen ist, daß tiefer im Auge gelegene Teile von hoher Magnesiumkonzentration umspült werden.

Messungen der zu Drucksenkungen führenden Magnesiumkonzentrationen.

Die wiedergegebenen Versuche ließen es unwahrscheinlich erscheinen, daß es durch druckmessende Untersuchungen möglich sein wird, eine Erklärung für die Magnesiumwirkung auf den Augendruck zu finden. Wir gingen daher dazu über, Messungen der Magnesiumkonzentrationen vorzunehmen. Wir benutzten die von *Kramer* und *Tisdall*[1]) angegebene Mikromethode der Magnesiumbestimmung, die sich auch für das Kammerwasser durchaus bewährte. Als Ausgangsmenge wird 1 ccm benötigt. Da man aus jedem Auge eines mittelgroßen Hundes meist 0,5 ccm Kammerwasser erhalten kann, ist es mit dieser Methode auch möglich, den normalen Magnesiumgehalt im ersten Kammerwasser eines Hundes zu bestimmen.

Über den Mg-Gehalt des Hundekammerwassers liegen Messungen unseres Wissens bisher nicht vor. Für das Kammerwasser des Pferdes geben *Mestrezat* und *Magitot*[2]) 0,003 g MgO in 100 ccm an. Wir fanden im Durchschnitt 0,002 g Mg in 100 ccm. Die Grenzen unserer Messungen lagen bei 0,0018 und 0,0024. Der gefundene Wert stimmt mit dem von *Mestrezat* und *Magitot* für das Pferd angegebenen wie auch mit den vom Blute bekannten Werten gut überein. Die prozentual noch relativ großen Schwankungen sind wohl kaum physiologisch, sondern methodisch bedingt. Da hier aber in Wirklichkeit Mengen von 0,00002 g gemessen werden, müssen wir uns mit der erreichten Genauigkeit begnügen.

---

[1]) *Kramer* und *Tisdall*, Mandel und Steudel, Mikromethoden zur Blutuntersuchung. Springer 1923.

[2]) *W. Mestrezat* und *A. Magitot*, Ann. d'oculist. **158**, 1. 1921.

Wir gingen dann zu Mg-Bestimmungen in Kammerwasser von Augen über, die mit metallischem Magnesium vorbehandelt waren. Wir fanden den Magnesiumgehalt immer erhöht, und zwar meist auf 4 bis 5 mg in 100 ccm. Der niedrigste nach 24 Stunden gemessene Wert betrug 3,3 mg. Auch hier bestand aber bereits eine Drucksenkung von 25 auf 16 mm Hg. Wurde der Versuch auf 3, 4 oder mehr Tage ausgedehnt, so war im allgemeinen der Magnesiumgehalt des Kammerwassers nicht höher, als wenn die Bestimmung bereits am zweiten Tage gemacht wurde. Die in das Auge eingeführte Magnesiummenge war in allen Fällen ungefähr die gleiche. Es war also etwa innerhalb von 24 Stunden ein Gleichgewicht zwischen Magnesiumauflösung und Abwanderung der Mg-Ionen aus dem Auge eingetreten, so daß sich der Mg-Ionengehalt des Kammerwassers auf einer konstanten Höhe hielt.

Wir hatten gesehen, daß es nicht möglich ist, durch Einbringen isotonischer $MgCl_2$-Lösungen in die vordere Kammer eine Erniedrigung des Augendrucks hervorzubringen, anscheinend weil dieses Salz zu schnell aus dem Auge herausdiffundiert. Es lag daher nahe zu versuchen, ob man den Mg-Gehalt des Blutes so weit erhöhen kann, daß vom Blute aus Magnesium in genügender Menge in das Auge gelangt, um hier eine Drucksenkung zu bedingen.

Wir führten diese Versuche am Hunde aus und steigerten die injizierte Menge so lange, bis wir eine Senkung des Augendrucks beobachten konnten. Das war dann der Fall, wenn wir im Laufe von 2 bis 3 Stunden pro Kilogramm Tier mindestens 0,4 g $MgCl_2$ in 5 proz. Lösung in Portionen von 10 bis 12 ccm subkutan injiziert hatten. Bei der Annahme einer gleichmäßigen Verteilung im ganzen Tiere und unter der Voraussetzung, daß inzwischen keine Mg-Ausscheidung erfolgt ist, war dann der Mg-Gehalt des ganzen Tieres etwa 4 mg pro 100 ccm. Er war also etwa auf das Doppelte des normalen Wertes gestiegen.

Die Annahme einer gleichmäßigen Verteilung und fehlender Ausscheidung ist mit großer Wahrscheinlichkeit nicht exakt gerechtfertigt. Es war daher nötig, im Blute und Kammerwasser dieser Tiere Magnesiumbestimmungen vorzunehmen. Das Ergebnis dieser Messungen zeigte, daß die Magnesiummenge im Blute sehr viel höher war, als bei einer gleichmäßigen Verteilung auf das ganze Tier angenommen werden mußte, andererseits aber auch wieder sehr viel niedriger, als es hätte sein müssen, wenn sich das Magnesium nur auf das Blut verteilt hätte. Die Magnesiumwerte im Blute, bei denen wir eine kräftige Drucksenkung beobachteten, lagen zwischen 10 und 20 mg in 100 ccm. Die Magnesiumkonzentration im Kammerwasser der Tiere mit Drucksenkungen auf die Hälfte bis zwei Drittel des Anfangswertes lag bei 5 bis 7 mg in 100 ccm.

In Abb. 3 ist ein Versuch wiedergegeben, bei welchem einem Hunde von 6,3 kg Gewicht im ganzen 50 ccm einer Lösung eingespritzt wurde, die 2,5 g kristallisiertes Magnesiumchlorid, somit 0,09 g wasserfreies Magnesiumchlorid oder 0,3 g Magnesium enthielt. Die Kurve zeigt, daß nach der dritten Injektion von 10 ccm dieser Lösung, nachdem also 0,18 g Magnesiumchlorid oder 3 mg Magnesium pro 100 g Tier injiziert worden sind, die Mg-Konzentration im Blute auf 6 mg gestiegen war, und daß nach dieser Injektion die Drucksenkung beginnt. Am Ende des Versuchs ist nach 5 Stunden der Druck von 28 mm auf 13,5 mm gesunken. Dabei sind im ganzen pro 100 g Tier 0,04 g kristallisiertes $MgCl_2$ = 4,8 mg Magnesium injiziert worden; der Magnesiumgehalt des Blutes beträgt aber 21 mg, der des Kammerwassers 7,3 mg.

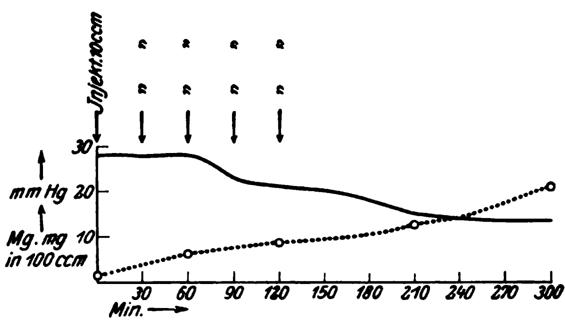


Abb. 3. Abhängigkeit des Augendruckes von der Mg-Konzentration im Blute.

Wir hatten aus den eingangs geschilderten Versuchen die Auffassung gewonnen, daß die Teile des Auges, auf welche sich die drucksenkende Magnesiumwirkung erstreckt, nicht in der vorderen Kammer zu suchen sind, sondern tiefer im Auge. Wir haben ferner gesehen, daß die Drucksenkung deutlich ausgesprochen ist bei einem Mg-Gehalt von 4 mg im Kammerwasser, wenn das Mg von dort aus in das Auge eindringt. Die Konzentration im hinteren Teile des Auges ist dann sicher nicht höher. Andererseits sehen wir, daß bei einem Mg-Gehalt von 6 mg in 100 ccm Blut die Druckabnahme eben beginnt, und daß, wenn der Mg-Gehalt des Blutes von seiner Normalkonzentration 2 mg auf durchschnittlich 15 gestiegen ist, der Mg-Gehalt des Kammerwassers von 2 auf durchschnittlich 6 gestiegen ist. Daraus ist zu schließen, daß bei einem Mg-Gehalt des Blutes von 6 mg der des Kammerwassers etwa 3 betragen wird. Wir müssen also auch nach dieser Betrachtung im hinteren Teile des Auges einen Mg-Gehalt von 3 bis 4 mg pro 100 ccm annehmen.

Diskussion.

Es bleibt uns auf Grund unserer Versuche die Frage zu erörtern, welches ist der Angriffspunkt des Magnesiums im Auge und wie haben

wir uns den Mechanismus der Druckherabsetzung zu denken? Wir hatten gesehen, daß der Angriffspunkt nicht in der vorderen Kammer liegt, und wir hatten gesehen, daß der Mechanismus mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht als Quellungs- bzw. Entquellungserscheinung aufzufassen ist. Durch Durchschneidungs-, Reizungs- und Adrenalinversuche ist erwiesen, daß der Sympathicus auf den Augendruck von großem Einfluß ist. Ob auch ein parasympathischer Einfluß auf den Augendruck besteht, ist nicht erwiesen. Ferner ist bekannt, daß Magnesium auf das Zentralnervensystem, aber auch auf alle anderen nervösen Gebilde narkotisierend wirkt[1]). Es ist daher mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß wir in der Senkung des Augendrucks durch Magnesium nichts anderes als eine Magnesiumnarkose nervöser, den Augendruck regulierender Elemente vor uns haben. Mit dieser Annahme ließen sich alle von uns und von *Römer* erhobenen Befunde in Einklang bringen.

In neuester Zeit hat *Gildemeister*[2]) eine neue Theorie der Narkosewirkung aufgestellt, die darin gipfelt, daß er als wesentlichstes Moment jeder Narkose eine Permeabilitätsverminderung ansieht. Permeabilitätsverminderung muß aber, gleichgültig, ob wir uns auf den Standpunkt der *Leber*schen Theorie der Kammerwasserbildung oder auf den physikalisch-chemischen von *Hamburger*, *Magitot* und *Mestrezat*[3]), *Römer* und *Weiss*, *Lehmann* und *Meesmann*[4]) und anderen vertretenen Standpunkt stellen, Senkung des intraokularen Druckes zur Folge haben. Auf Grund der *Gildemeister*schen Narkosetheorie wären daher, auch ohne daß spezifische druckregulierende Nervenendigungen von der Narkose betroffen werden, die Resultate verständlich.

Es erscheint uns sicher, daß es sich bei der erniedrigenden Wirkung des Magnesiums auf den Augendruck um eine narkotische Wirkung handelt, ohne daß wir entscheiden können, ob es sich um eine Narkose der Nervenendigungen oder um eine narkotische Wirkung auf die zwischen Blut und intraokularer Flüssigkeit eingeschalteten Membranen im Sinne der *Gildemeister*schen Theorie handelt.

Zusammenfassung.

Ein von Prof. *Atzler* konstruiertes Manometer zur Messung der intraokularen Tension wird beschrieben.

Die drucksenkende Wirkung des in die vordere Augenkammer gebrachten Magnesiums wird bestätigt.

---

[1]) *J. Meltzer* und *J. Auer*, Amer. Journ. of Phys. **14**, **15**, **16**. 1905/06.

[2]) *M. Gildemeister*, Vortrag i. d. Deutsch. Phys. Gesellschaft. Tübingen 1923.

[3]) *Magitot* und *Mestrazat*, Annales D'oculist **158**, 1, 1921.

[4]) *G. Lehmann* und *A. Meesmann*, Pflügers Arch. **205**. 210. 1924.

Die Alkaleszenz des Kammerwassers nimmt dabei zu, doch kann die Erhöhung der OH-Ionenkonzentration nicht die Ursache der Drucksenkung sein, da diese im Gegenteil Drucksteigerung bewirkt.

Mit $MgCl_2$ läßt sich bei Injektion ins Auge keine Drucksenkung hervorbringen.

Der normale Magnesiumgehalt des Hundekammerwassers beträgt 2 mg in 100 ccm.

Steigt der Mg-Gehalt im hinteren Teile des Auges durch Einlegen von Magnesium in die vordere Kammer oder durch subkutane Injektion von $MgCl_2$ auf 3 bis 4 mg in 100 ccm, so tritt Drucksenkung ein. Die druckerniedrigende Wirkung ist als Narkosewirkung auf Nervenendigungen oder auf die zwischen Blut und intraokularer Flüssigkeit eingeschalteten Membranen aufzufassen.

Untersuchungen zur Lehre von der Blutgerinnung.

XI. Mitteilung:

Über die Entbehrlichkeit des Kalkes für den Gerinnungsprozeß.

Von

Bernhard Stuber und **Fritz Focke.**

(Aus dem Laboratorium der medizinischen Klinik zu Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 7. November 1924.)

In unserer früheren Mitteilung[1]) haben wir auf Grund von physikalisch-chemischen Untersuchungen die Hemmung der Blutgerinnung durch Oxalate und Citrate auf die Bildung eines ionisierten, nicht mehr koagulablen Fibrinogenkomplexsalzes zurückgeführt. Wir haben dort den Beweis erbracht, daß die gerinnungshemmende Wirkung dieser Salze nicht, wie seither allgemein angenommen wurde, auf der Eliminierung bzw. Entionisierung des Kalkes beruht. Damit mußte aber auch logischerweise die Bedeutung des Kalkes für den Gerinnungsprozeß im Sinne der Fermentlehre abgelehnt werden. Eine wesentliche Stütze dieser Lehre wird dadurch erschüttert. Wir hatten in unserer eingangs erwähnten Arbeit schon darauf hingewiesen, daß es, um die Gerinnung durch Zusatz von Oxalaten bzw. Citraten völlig aufzuheben, erforderlich ist, ein Vielfaches dieser Salze von der für den gesamten Blutkalk berechneten Menge zuzusetzen. Diese Tatsache ist auf Grund der Anschauung der Fermentlehre, wonach die Ursache der Salzhemmung in der Ausfällung bzw. Entionisierung des Blutkalkes beruht, völlig unverständlich. Bestimmt man z. B. bei einem Tiere den gesamten Blutkalk, berechnet danach die zur Ausfällung des gesamten Kalkes nötige Oxalatmenge und fängt nun das Blut in der doppelten bis dreifachen Oxalatmenge auf, so gerinnt das Blut, obwohl sich in demselben ein Überschuß von Oxalat nachweisen läßt. An eine Wirkung des Calciumions ist unter diesen Umständen gar nicht zu denken. Diese schon lange bekannte Tatsache führte uns zur experimentellen Frage-

[1]) Diese Zeitschr. **134**, 1922.

stellung unserer früheren Arbeit und schließlich zur Ablehnung der Fermentlehre. Wir finden auch in der Literatur bis heute keinen eindeutigen Beweis, der unsere experimentell begründeten Anschauungen widerlegen könnte. Wir verzichten heute auf eine kritische Betrachtung scheinbar entgegenstehender Daten der Literatur. Dies soll erst nach Erreichung des uns gesteckten Zieles zusammenfassend geschehen. Zunächst gilt unser Bemühen einer möglichst vollständigen experimentellen Begründung unserer Vorstellungen. Diese Arbeit soll eine weitere Stütze für unsere Ansicht von der Entbehrlichkeit des Kalkes für den Gerinnungsprozeß liefern. Wenn unsere Ansicht von der kalkfreien Gerinnung richtig ist, so muß sich nach beendetem Gerinnungsprozeß das Fehlen des Kalkes nachweisen lassen. Die einzig exakte Methode kann hier nur die chemische Analyse sein. Am geeignetsten hierfür erschien uns die überaus empfindliche Mikromethode von *de Waard*[1]).

Die Angaben von *de Waard*, daß im Serum durch Zusatz von gesättigter Ammonoxalatlösung direkt sämtlicher Kalk, auch der sogenannte gebundene, ausgefällt wird, können wir auf Grund zahlreicher Bestimmungen bestätigen, und diesen Befund auch auf die Kalkbest.mmung im Plasma ausdehnen. Serum und Plasma stammten von Menschen, Kaninchen und Hunden. Das Blut wurde unter den bekannten Kautelen entnommen, um Plasma zu erhalten. Die direkte Fällungsmethode lieferte dieselben Werte, wie die Veraschung. Nur mußte bei der direkten Fällung für besonders sorgfältige Auswaschung des Calciumoxalatniederschlages Sorge getragen werden. Ist das nicht der Fall, so können die Werte, vor allem im Plasma, bei der direkten Methode etwas höher gefunden werden, als bei der Veraschung. Anscheinend werden in der salzreichen Lösung Spuren von Eiweiß durch den Oxalatniederschlag mitgerissen.

Für die eigentlichen Gerinnungsversuche benutzten wir Blut von Kaninchen und Hunden. Das Blut wurde direkt aus der Carotis in die Oxalatlösung, die sich in paraffinierten Zentrifugengläsern befand, aufgefangen. Die Oxalatmenge wurde auf Grund des vorher bestimmten Blutkalkwertes berechnet, sie betrug immer mehr, als dem gefundenen Kalkwert entsprach, und wurde in den verschiedenen Blutproben sukzessive bis auf das Mehrfache gesteigert (s. Protokoll). Die Kalkwerte bei unseren Versuchstieren (nach 24stündigem Hungern) schwankten zwischen 7 bis 8 mg-Proz. Gesamtkalk. Es wurde für die Berechnung der nötigen Oxalatmenge immer der gefundene Höchstwert zugrunde gelegt. Der Oxalatzusatz erfolgte in steigender Menge (s. Protokoll). Das war nötig, weil immer diejenige Konzentration gefunden werden mußte, bei der die Gerinnung noch vollständig, aber so verzögert eintrat, daß das gebildete Calciumoxalat quantitativ vor Eintritt der Gerinnung abzentrifugiert werden konnte, da es sonst

[1]) Diese Zeitschr. **97**, 1919.

bei der nachfolgenden Veraschung durch die Zerstörung der Oxalsäure als Calciumoxyd in der Asche zurückgeblieben wäre und so ein Vorhandensein von Kalk vorgetäuscht hätte. Wir gingen bei unseren Versuchen so vor, daß das Blut, nachdem es aus der Carotis direkt in der Oxalatlösung aufgefangen war, sofort zentrifugiert wurde (20 Minuten bei 3000 Umdrehungen). Das Plasma wurde dann abgehoben und erneut etwa $^3/_4$ Stunden in die Zentrifuge gebracht. In den meisten Versuchen war dann das Plasma bei der Herausnahme aus der Zentrifuge schon geronnen. Das geronnene Plasma wurde dann mit der Pinzette aus den Zentrifugengläsern herausgenommen und die unterste Spitze, um das abzentrifugierte Calciumoxalat zu entfernen, abgeschnitten. Das geronnene Plasma, das noch Serum eingeschlossen hielt, wurde dann nach der *de Waard*schen Methode auf Kalk untersucht. Es wurde immer die Veraschungsmethode im Platintiegel durchgeführt. Wir geben im folgenden einige Beispiele aus unseren Versuchsreihen.

Tabelle I.

Blutmenge	Oxalatkonzentration (1 proz. Na-Oxalat)	Gerinnung	Kalk
5 ccm	0,20 ccm	+	—
5 „	0,22 „	+	—
5 „	0,26 „	+	—
5 „	0,28 „	+	—
5 „	0,30 „	+	—
5 „	0,32 „	unvollständig	keine Analyse
5 „	0,28 „	+	Spuren
5 „	0,31 „	+	Spuren
5 „	0,34 „	keine Gerinnung	keine Analyse

Bei sämtlichen Versuchen war im Serum ein Überschuß von Oxalat nachweisbar. Zur Ausfällung des Blutkalkes (8 mg-Proz.) hätten 0,13 ccm Oxalatlösung genügt.

Wie aus Tabelle I zu ersehen ist, gelingt es bei geeignetem Oxalatzusatz trotz Überschuß desselben, berechnet auf den gesamten Blutkalk, das Blut zur Gerinnung zu bringen. Die Aschenanalysen von geronnenem Plasma und Serum ergaben in der Mehrzahl der Versuche ein völliges Fehlen von Kalk. In einzelnen Versuchen wurden, trotz Überschuß von Oxalat, in den Aschen Spuren von Kalk aufgefunden. Es lag die Vermutung nahe, daß in diesen Fällen das Abzentrifugieren des Calciumoxalats nicht quantitativ gelang. Das war um so wahrscheinlicher, als in diesen Versuchen das Plasma beim zweiten Zentrifugieren beim Herausnehmen aus der Zentrifuge schon geronnen war. Es ließ sich auch zeigen, daß Plasma, das nach dem Zentrifugieren keinen Niederschlag von Calciumoxalat aufwies, nach Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung zu gleichen Teilen und erneutem Zentrifugieren ein deutliches Sediment von Calciumoxalat bildet. War damit die Schwierig-

keit der quantitativen Entfernung des Calciumoxalats in dem viskösen Plasma durch Zentrifugieren gegeben, was um so mehr ins Gewicht fiel, als die Oxalatkonzentration nicht so hoch gewählt werden konnte, daß das Plasma flüssig blieb, so mußte versucht werden, das Niederreißen des Calciumoxalats während des Zentrifugierens zu begünstigen. Dazu erwies sich das Kaolin am geeignetsten. Da dasselbe Spuren von Kalksalzen enthält, wurde es vor dem Gebrauch mit Salzsäure vom Kalk befreit und danach chlorfrei gewaschen. Das abzentrifugierte und dann abgeheberte Oxalatplasma wurde mit 0,05 bis 0,1 g Kaolin versetzt, durchgeschüttelt, so daß das Kaolin gleichmäßig im Plasma suspendiert war, und dann erneut etwa eine halbe Stunde zentrifugiert. Nach eingetretener Gerinnung wurde der geronnene Plasmaklumpen, der noch Serum eingeschlossen hielt, nachdem der unterste Teil mit dem abzentrifugierten Kaolin abgeschnitten war, verascht. Wir geben in Tabelle II unsere diesbezüglichen Versuche wieder.

Tabelle II. Kaolinversuche.

Blutmenge	Oxalatkonzentration (1 proz. Kaliumoxalat)	Gerinnung	Kalk	Blutmenge	Oxalatkonzentration (1 proz. Kaliumoxalat)	Gerinnung	Kalk
5 ccm	0,39 ccm	+	—	5 ccm	0,40 ccm	+	—
5 „	0,39 „	+	—	5 „	0,40 „	+	—
5 „	0,39 „	+	—	5 „	0,40 „	+	—
5 „	0,41 „	+	—	5 „	0,42 „	+	—
5 „	0,40 „	+	—	5 „	0,42 „	+	—
5 „	0,40 „	+	—	5 „	0,45 „	+	—
5 „	0,40 „	+	—	5 „	0,45 „	+	—
5 „	0,40 „	+	—	5 „	0,45 „	+	—
5 „	0,40 „	+	—				

In sämtlichen Versuchen Oxalatüberschuß nachweisbar.

Aus den Versuchen dieser Tabelle kann entnommen werden, daß es durch Kaolinausschüttelung gelingt, ein *völlig kalkfreies Plasma* zu erhalten. *Dieses Plasma gerinnt vollständig, trotz Fehlens von Kalk und bei Anwesenheit von Oxalat* in bestimmter Konzentration. Auch die Aschenanalysen des geronnenen Plasmas ergaben in allen Versuchen ein Fehlen von Kalk. Da das Blut bei der Entnahme aus dem Gefäß unter allen Kautelen direkt in der Oxalatlösung aufgefangen, also sofort entkalkt wurde und auch weiterhin dauernd ein Oxalatüberschuß vorhanden war, kann eine Thrombinbildung im Sinne der Fermentlehre gar nicht in Frage kommen. Um jedoch einen diesbezüglichen Einwand völlig auszuschließen, wurden noch Versuche mit intravenöser Injektion des Oxalatsalzes ausgeführt. Die Blutmenge der Versuchstiere wurde nach dem Körpergewicht berechnet und die Oxalatkonzentration, wie in den obigen Versuchen, so gewählt, daß das Blut einen Überschuß von Oxalat enthielt, aber seine Gerinnungsfähigkeit

noch erhalten blieb. Da bei der intravenösen Oxalatinjektion sehr rasch ein Herzstillstand eintritt und infolgedessen die Mischung von Oxalatsalz und Blut oft nicht gleichmäßig erfolgt, so war es nicht leicht, die geeignete Konzentration zu finden. Es war dazu eine Reihe von Vorversuchen nötig. Daß aber bei geeigneter Versuchstechnik auch unter diesen Bedingungen eine kalkfreie Gerinnung möglich ist, zeigt das folgende Beispiel:

Tabelle III.

Kaninchen. 1900 g Gewicht.

Oxalat, intravenös	Blutmenge aus Carotis	Gerinnung	Kalk
4 ccm 2 proz. Kaliumoxalat	30 ccm Plasma mit Kaolinzusatz abzentrifugiert	+	—

Damit dürfte also auf exakte chemisch-analytische Weise der Beweis erbracht sein, daß die Blutgerinnung auch ohne Anwesenheit von Kalk eintreten kann.

Über den Blutchemismus im Schlaf.

Von

Kl. Gollwitzer-Meier und **Chr. Kroetz.**

(Aus der medizinischen Klinik der Universität Greifswald.)

(Eingegangen am 10. November 1924.)

Der Zusammenhang zwischen Kationen- und Säurebasengleichgewicht, wie ihn tierexperimentelle Untersuchungen erwiesen haben[1]), führte zu der Frage, ob in verschiedenen physiologischen und pathologischen Zuständen, die nachweisbar mit einer abnormen Einstellung der Blutreaktion verknüpft sind, Umstimmungen im Mineralgehalt bestehen, ferner, wenn sie bestehen, ob sie die primäre Ursache der Reaktionsverschiebungen sein können.

Eine der auffallendsten Veränderungen der Blutreaktion unter physiologischen Verhältnissen findet sich im Schlaf. Nach den Untersuchungen von *Straub*[2]) steigt im Schlaf die CO_2-Spannung im Blute an. Die Verschiebung der Blutreaktion beruht ausschließlich auf dieser ungenügenden Abdunstung der Kohlensäure durch Verringerung des Atemvolumens [*Endres*[3])]. Durch die Retention der flüchtigen Säure wird die Summe der sauren Valenzen im Blute vermehrt, während die der basischen Valenzen, soweit sie für die Kohlensäurebindung in Frage kommen, unverändert bleibt. Das Säurebasengleichgewicht erfährt dadurch ein Übergewicht nach der sauren Seite, die Blutreaktion wird im Schlaf saurer. Sehen wir in der H-Ionenkonzentration des Blutes den Atemreiz, so stellt eine Erhöhung der H-Ionenkonzentration einen Reizzuwachs dar, demgegenüber das Atemzentrum im Schlaf nicht seine normale Empfindlichkeit besitzt. Die Erregbarkeit des Atemzentrums für diesen Reiz ist im Schlaf herabgesetzt. Die Ursache dieser Verschiebung der Reizschwelle des Atemzentrums ist nicht bekannt. Da die Größe des H-Ionenreizes durch bestimmte andere Ionen modifiziert werden kann, so ergab sich besonders die im folgenden

---

[1]) *Kl. Gollwitzer-Meier*, diese Zeitschr. **151**, 54, 1924.

[2]) *H. Straub*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **117**, 397, 1915.

[3]) *G. Endres*, diese Zeitschr. **142**, 53, 1924.

behandelte Fragestellung, ob sich im Schlaf eine Verschiebung dieses Ionengleichgewichts im Blute nachweisen läßt, das die Atemveränderung zu erklären imstande ist.

Versuchsanordnung.

Die Versuche wurden an Ärzten der Klinik vorgenommen, die mit der Alveolaranalyse vertraut waren. Sie erhielten abends eine reine Kohlehydratmahlzeit. 4 bis 5 Stunden nach dem Essen und nachdem sie sich zur Ruhe gelegt hatten, wurden Analysen der Alveolarluft nach *Haldane* vorgenommen und anschließend aus der Armvene Blut entnommen, von dem ein Teil in einem Wägegläschen aufgefangen und mit Natr. oxal. versetzt, ein größerer Teil in ein Zentrifugenglas unter Paraffin abgelassen wurde. Ungefähr 2 Stunden nach Eintritt des Schlafes wurde die Versuchsperson mit einem kurzen Anruf geweckt und sofort die Alveolarluftanalyse und Blutentnahme wiederholt. Die Abtrennung von Blutkörperchen und Serum erfolgte noch während der Nacht, die Verarbeitung sofort am Morgen.

Methodik.

Von dem mit Oxalat versetzten Blut wurde die Kohlensäurebindungskurve gewonnen, aus ihr und den Alveolarwerten die Wasserstoffzahl rechnerisch bestimmt. Ein schon vorher abgetrennter Teil des Blutes wurde einige Minuten gründlich mit Luft geschüttelt zur Entfernung der Kohlensäure und davon je 0,1 ccm in Hämatokritröhrchen pipettiert und bis zur Volumkonstanz zentrifugiert. Im Serum wurden bestimmt: die CO_2-Vol.-Proz., die, vermindert um die Größe der freien Kohlensäure, das Bicarbonat ergaben, Na, K und Ca nach *Kramer* und *Tisdall*, Cl nach *Volhard*, säurelöslicher P nach *Greenwald* und die Trockensubstanz. Von besonderer Bedeutung für die genaue Analyse ist das Auffangen des Blutes unter Paraffin und die Abtrennung des Serums unter Paraffin. Durch Ionenverschiebungen zwischen Blutkörperchen und Serum, wie sie Kohlensäureverluste beim Stehen des Blutes an der Luft herbeiführen, werden vor allem die HCO_3- und Cl-Werte beeinflußt und die Bilanzen dadurch gestört.

Die Untersuchung der *Alveolarluft*, der *Kohlensäurebindung* und der *aktuellen Blutreaktion* vor und im Schlaf ergab in Übereinstimmung mit *Straub* und *Endres* ein Ansteigen der CO_2-Spannung im Schlaf. Die Kohlensäurebindungskurve, die uns einen Maßstab für die Größe der Alkalireserve gibt, bleibt entweder ganz unverändert oder erfährt kleine Bewegungen nach oben oder unten (1 bis 2 Vol.-Proz.), die jedoch nicht ausreichen, die Kohlensäurespannung zu kompensieren, auch durchaus nicht als Kompensationsvorgang aufzufassen sind, da die Verschiebung nicht immer in dem zu erwartenden Sinne vor sich geht. Wenn die Veränderung des Säurebasengleichgewichts in jedem einzelnen Falle neuerdings verfolgt wurde, trotzdem der Einfluß des Schlafes hierauf bereits bekannt war, so geschah es in der Absicht, auf solche Weise quantitative Beziehungen zwischen Mineralgehalt und Säurebasengleichgewicht errechnen zu können.

Die richtige Beurteilung des Salzbestandes im Blute setzt die Kenntnis eventueller *Wasserverschiebungen zwischen Blut und Gewebe*

voraus, die Änderungen im Salzgehalt vortäuschen können. Tatsächlich ließen sich in unseren Versuchen regelmäßig deutliche Verschiebungen des Wassergehalts, und zwar im Sinne einer Wasserzunahme im Serum nachweisen. Allgemein ist folgendes zu sagen. Bei den Wasserbewegungen im Serum haben wir zu unterscheiden einmal zwischen einem Wassereinstrom aus dem Gewebe ins Blut, zweitens einem Wassereinstrom aus dem Serum in die Blutkörperchen, der abhängig von der Kohlensäurespannung zu einer Eindickung des Serums führt.

Über Wasserverschiebungen zwischen Gesamtblut und Gewebe kann die Volumenbestimmung der Blutkörperchen im Hämatokriten Aufschluß erteilen, vorausgesetzt, daß Änderungen in der Größe der abgelesenen Blutkörperchensäule nicht auf Verschiedenheiten des Volumens des einzelnen Blutkörperchens beruhen, sondern auf Verschiedenheiten der Blutkörperchenmenge bei gleichbleibendem Volumen des einzelnen Körperchens. Da die Kohlensäure das Blutkörperchenvolumen stark beeinflußt, wurde sie in allen Blutproben gleichmäßig ausgeschüttelt. Durch die Ausschaltung dieses für die Körperchengröße maßgebenden Faktors konnten die Hämatokritwerte ausschließlich zur Beurteilung der Blutkörperchenmenge Verwendung finden. In allen Versuchen[1]) nahmen die Hämatokritwerte im Schlaf ab, was wir als Blutverwässerung aufzufassen haben, die auf einem Wassereinstrom aus dem Gewebe in das Blut beruhen dürfte.

In derselben Richtung weist auch das Verhalten der Trockensubstanz im Serum. Sie ist in dem Schlafblut stets verringert. Diese Änderung besagt, daß die Summe der organischen und anorganischen Bestandteile im Schlaf abnimmt. Die wirkliche Abnahme ist noch größer zu bewerten, als sie in den Versuchszahlen zum Ausdruck kommt, denn die Wasserverschiebung zwischen Blutkörperchen und Serum bei der beobachteten Erhöhung der Kohlensäurespannung müßte bei reinen Verhältnissen zu einer Eindickung des Serums führen.

Wenden wir uns nun dem *Salzgehalt des Serums* zu. Von den *Anionen* bleibt das *Bicarbonat* des Serums im Schlaf nahezu unverändert, entsprechend dem Verhalten der gebundenen Kohlensäure im Gesamtblut, die ihren Ausdruck in der Kohlensäurebindungskurve findet. Die durch Erhöhung der Kohlensäurespannung bedingte Mehrbindung von Kohlensäure ist nur sehr gering, 2 bis 3 Vol.-Proz., und kommt infolge der Blutverwässerung in den Versuchen nicht zum

---

[1]) Versuch 6 scheidet für den Vergleich (auch hinsichtlich der übrigen Daten) aus. Er weist keine von den Veränderungen im Wasser- und Ionenbestande auf, die in den übrigen Versuchen beobachtet wurden. Wahrscheinlich hat die leicht erregbare Versuchsperson zwischen der ersten und zweiten Blutentnahme nur wenig tief geschlafen. Die Veränderungen im Blut wären bei ihr wohl erst später nachzuweisen gewesen.

Ausdruck. In Versuch 1 steigt die Bicarbonatmenge auffallend an, vielleicht im Zusammenhang mit der starken Erhöhung der Kohlensäurespannung, wenn anders ein Versuchsfehler ausgeschlossen werden kann.

Einheitliche und deutliche Veränderungen sind im *Chlorid- und Phosphatgehalt* des Serums zu beobachten. Die Chloride nehmen im Schlaf zu. Berücksichtigt man die gleichzeitige Blutverdünnung, so wird diese Zunahme um so auffallender. Ebenso bemerkenswert ist die erhebliche Zunahme des säurelöslichen Phosphors, die im Durchschnitt 26 Proz. beträgt. In einer uns nach Beendigung der Versuche bekannt gewordenen Arbeit teilen auch *Haldane, Wigglesworth* und *Woodrow*[1]) die Beobachtung mit, daß der Phosphatspiegel im Blute während des Schlafes ansteigt. Wie ist diese Anionenzunahme zu erklären? Es muß aus den Geweben Flüssigkeit in das Blut abströmen, die einen größeren Cl- und P-Gehalt aufweist als das Serum selbst und so zu einer Verdünnung der gesamten Serumbestandteile führen kann, während der Gehalt an Cl und P zunimmt. Die gleichzeitige Vermehrung der Phosphatausscheidung im Schlaf, wie sie *Kleitman*[2]) und *Wordell*[3]) nachgewiesen haben, spricht bei der Bewertung des Phosphatanstiegs im Serum gegen die Annahme, daß es sich um eine mangelhafte Phosphatausscheidung handeln könne.

Die Untersuchung der *Kationen* gibt noch weitere Aufklärung. Wir finden regelmäßig auch eine Erhöhung des *Natrium*spiegels im Schlaf, während *Kalium* und *Calcium* bei Berücksichtigung der Mittelwerte aller Versuche weder zu- noch abnehmen.

Betrachten wir die Mengenverhältnisse, in denen diese Zunahme der Anionen Cl und P und des Kations Na vor sich geht, so ergibt sich für das Natrium eine durchschnittliche Zunahme von 0,0028 Äquivalenten, der für das Chlor eine Zunahme um 0,0024 und den Phosphor um 0,0004 gegenübersteht. (Dabei wird die Annahme gemacht, daß das Phosphat zu gleichen Teilen als primäres und sekundäres Phosphat vorhanden ist.) Die Umrechnung auf konstanten Wassergehalt wurde unterlassen, da sie sich für alle Ionen in einer gleichmäßigen Korrektur äußern würde. Chlor und Phosphate werden nach dieser Berechnung ausschließlich in Natriumbindung dem Blute zugeführt werden. *Es findet somit ein Einstrom einer kochsalz- und phosphatreichen und eiweißarmen Flüssigkeit aus dem Gewebe in das Blut statt.* Zu der letzteren Annahme führte folgende Überlegung. Die Verminderung der Trocken-

[1]) *I. B. S. Haldane, Wigglesworth* und *Woodrow*, Proc. of the royal. Soc. of London Ser. B. **96**, 1, 1924.

[2]) *Kleitman*, Amer. Journ. of Physiol. **66**, 67, 1923.

[3]) *H. Wordell*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **52**, 389, 1924.

substanz im Serum (bei Zunahme der quantitativ wichtigen anorganischen Bestandteile Natrium und Chlor und bei gleichbleibender Bicarbonatkonzentration) kann nur auf einer bedeutenden Abnahme organischer Substanz, also vor allem der Eiweißkörper beruhen. Die einströmende Flüssigkeit wird also relativ eiweißarm sein.

Daß bei den verschiedensten physikalischen Einwirkungen auf den Organismus solche differenten Bewegungen von Wasser, Eiweiß und Salz zwischen Gewebe und Blut stattfinden, ist durch Untersuchungen von *Bogendörfer* und *Nonnenbruch*[1]) bekannt, welche bei warmen Bädern und im Lichtbade ähnliche Befunde erhoben. *Kroetz*[2]) hat im Lichtbade den Abstrom einer eiweiß- und NaCl-reichen Flüssigkeit in das Serum beobachtet. Auch unter Röntgeneinfluß kommt nach *Bernhardt*[3]) und *Kroetz*[4]) eine differente Bewegung des Eiweißes und der einzelnen Ionen zur Beobachtung.

Das *Anionendefizit* zeigt nur geringe Änderungen im Schlaf, entsprechend der Tatsache, daß die Summe der gesamten anorganischen Anionenäquivalente in ungefähr demselben Maße zunimmt, wie die der Kationenäquivalente. Das Anionendefizit, das auf einem Überschuß anorganischer Kationen im Serum beruht, beträgt vor dem Schlaf im Mittel 15,6 Proz. der basischen Äquivalente. Es entspricht dieser Wert durchaus den von anderen Autoren [*Kramer* und *Tisdall*[5]), *Briggs*[6]), *Kroetz*[7])] mitgeteilten Normalbefunden. Im Schlaf wird das Anionendefizit etwas herabgesetzt auf einen Mittelwert von 14,2 Proz. Da die Größe dieses Defizits wahrscheinlich fast nur von dem Eiweißgehalt des Serums bestimmt wird, so weist eine Abnahme des Defizits ebenfalls auf eine Verringerung des Serumeiweißgehalts hin, wie sie bereits aus anderen Feststellungen geschlossen wurde, und bildet so eine wertvolle Bestätigung für die Richtigkeit unserer Beobachtung.

Die Auswertung der Versuche ergab bisher die wichtige Tatsache des Wasser- und Salzeinstroms aus dem Gewebe in das Blut während des Schlafes, die zu einer relativen Hydrämie, Hyperchlorämie, Hyperphosphatämie und Hypalbuminose führt.

Zur Beantwortung der eingangs aufgeworfenen Frage nach der Ursache der veränderten Empfindlichkeit des Atemzentrums ist es

[1]) *Bogendörfer* und *Nonnenbruch*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **133**, **392**, 1920.

[2]) *Kroetz*, diese Zeitschr. 1924 (im Druck).

[3]) *Bernhardt*, Klin. Wochenschr. **2**, 1795, 1923.

[4]) *Kroetz*, diese Zeitschr. **151**, 146, 1924.

[5]) *Kramer* und *Tisdall*, zitiert nach *Briggs*.

[6]) *Briggs*, Journ. of biol. Chem. **57**, 244, 1923.

[7]) *Kroetz*, l. c.

aber erforderlich, nicht wie bisher die absolute Zu- oder Abnahme einzelner Ionen zu verfolgen, sondern das *Gleichgewicht bestimmter Ionen* zu bestimmen, das für die normale Erregbarkeit des Atemzentrums von Bedeutung ist[1]). Wenngleich die Erregbarkeit des Atemzentrums abhängig ist von der Summe all der Faktoren, die auf den physikalisch-chemischen Zustand der nervösen Elemente Einfluß haben, so lassen sich doch die wichtigsten Komponenten der anorganischen Beeinflussung herausschälen, die wir hier im K, Ca, Mg und P zu suchen haben (das äußerst wirksame H-Ion wird gesondert verfolgt und seine Wirkung auf das Atemzentrum als „Atemreiz" betrachtet). Die Erregbarkeit des Atemzentrums ist bis zu einem gewissen Grade abhängig von der Größe des Quotienten $\frac{(K^{\cdot}) \cdot (HPO_4'' + H_2PO_4')}{(Ca^{\cdot\cdot})(Mg^{\cdot\cdot})}$. Dieser Quotient der äquivalenten Konzentration von K, Ca und P erfährt im Schlaf regelmäßig eine Zunahme, die auf dem Anstieg der Phosphatwerte beruht[2]). Danach müßte auch die Erregbarkeit des Atemzentrums im Schlaf zugenommen haben, während sie tatsächlich abgenommen hat, sofern wir die Wasserstoffzahl des Blutes als Maß der Erregbarkeit betrachten können. Ebenso wie aber die Wasserstoffionenkonzentration des Blutes nicht den eigentlichen Atemreiz darstellt, sondern vielmehr die Wasserstoffionenkonzentration im Atemzentrum selbst, ist auch nicht die Größe des Ionenverhältnisses im Blute, sondern letzten Endes im Atemzentrum selbst für die Erregbarkeit des Zentrums von Bedeutung. Wenn man für gewöhnlich die Verhältnisse im Blute in direkte Beziehung zu denen im Atemzentrum setzt, so hat dies überall dort eine gewisse Berechtigung, wo wir *primär* Änderungen im Säurebasen- und Ionengleichgewicht *im Blute* vor uns haben; es sind dies die Fälle, wo wir von einer hämatogenen Beeinflussung des Atemzentrums zu sprechen haben. Dabei ist es ohne Bedeutung und auch nicht abzusehen, ob die sekundäre Gleichgewichtsänderung im Atemzentrum, die die beobachtete Reaktion auslöst, gleichsinnig der primären hämatogenen ist oder nicht. Andererseits brauchen primär lokale Säurebasen- und Ionenverschiebungen im Atemzentrum selbst nicht zu nachweisbaren Gleichgewichtsveränderungen des Blutes führen. Ein solches Verhalten charakterisiert die zentrogene Störung sowohl der Erregung als der Erregbarkeit des Atemzentrums.

Wir können nunmehr an die Frage herantreten, handelt es sich im Schlaf um eine hämatogene oder zentrogene Änderung der Erregbarkeit des Atemzentrums. Der Nachweis einer Ionengleichgewichts-

---

[1]) *Kl. Gollwitzer-Meier*, l. c.

[2]) Mg wurde nicht bestimmt.

störung im Blute legt die Annahme einer hämatogenen Beeinflussung nahe. Die mögliche hämatogene Beeinflussung des Atemzentrums bestünde aber in einer Steigerung der Erregbarkeit, die mit der tatsächlichen Beobachtung im Widerspruch steht. Zweierlei Annahmen sind denkbar. Entweder enthält der berücksichtigte Ionenquotient nicht sämtliche Glieder, von denen die Erregbarkeit des Atemzentrums tatsächlich abhängt. Da aber die anorganischen Elemente nahezu vollständig in Rechnung gezogen sind und grundlegende Umstellungen im organischen Haushalt durch keinen in diesen Versuchen erhobenen Befund wahrscheinlich gemacht sind — es handelt sich hier natürlich immer nur um die Verhältnisse im Blute —, so möchten wir diesem Einwand kein besonderes Gewicht beilegen. Die andere Möglichkeit, daß es sich nämlich um eine zentrogene Störung handelt, rückt dadurch in den Vordergrund. Über die stofflichen Vorgänge, die dieser zentrogenen Störung zugrunde liegen, sind uns selbst Vermutungen nicht möglich. Diese zentrogene Umstellung stellt wahrscheinlich einen primären Vorgang dar, der durch Verminderung der Atemtätigkeit zu einer Kohlensäurestauung nicht nur im Blute, sondern im gesamten Gewebe führt. Die leicht in das Gewebe diffundierende Kohlensäure verdrängt andere Ionen, besonders Cl- und P-Ionen in das Blut, woselbst durch diese Verschiebung das Gleichgewicht in der beschriebenen Weise umgestellt wird. Obwohl diese sekundäre Bewegung dahin gerichtet ist, daß sie theoretisch zu einer Erregbarkeitssteigerung im Atemzentrum Anlaß geben könnte, finden wir doch die Blutreaktion im Schlaf nach der sauren Seite hin verändert, ein Ausdruck dafür, daß die primär zentrogene Veränderung über die sekundäre überwiegt.

Zusammenfassung.

Während des Schlafes findet ein Einstrom einer NaCl- und phosphatreichen und eiweißarmen Flüssigkeit aus dem Gewebe in das Blut statt, der zu einer Blutverdünnung, einer relativen Hypalbuminose, Hyperchlorämie und Hyperphosphatämie führt. Der Einstrom von Anionen und Kationen geht in äquivalenten Mengen vor sich. Das Anionendefizit des Serums erfährt eine geringe Abnahme entsprechend der Verringerung des Eiweißgehalts. Der HCO_3-, K- und Ca-Spiegel bleibt unbeeinflußt.

Die Abnahme der Erregbarkeit des Atemzentrums im Schlaf, wie sie die Blutacidose beweist, kann nicht primär hämatogen ausgelöst sein. Es bleibt nur die Annahme einer zentrogenen Änderung der Erregbarkeit des Atemzentrums, die zu einer CO_2-Stauung nicht nur im Blute, sondern auch im Gewebe führt und Ursache der Cl- und P-Verdrängung in das Blut ist.

Protokolle.

Nr.	Name	Zeit der Entnahme	Anionen						Kationen						Äquivalente		Anionendefizit		Trockensubstanz	Hämatokrit	$Q = \frac{K \times P}{Ca}$	p_H des Blutes	Alveolare CO_2-Spannung
			Cl		HCO_3		(P säurelöslich)		Na		K		Ca		Anionen	Kationen	absolut	Proz.					
			mg-Proz.	Äquiv.	Vol.-Proz.	Äquiv.	mg-Proz.	Äquiv.	mg-Proz.	Äquiv.	mg-Proz.	Äquiv.	mg-Proz.	Äquiv.									
1	*En.*	vor	565	0,0965	50,5	0,0225	3,7	0,0018	312	0,1359	21,6	0,0054	10,9	0,0054	0,1208	0,1467	0,0289	18,7	9,09	47,0	1,8	7,30	42,5
		im	581	0,0995	56,6?	0,0252?	4,1	0,0020	324	0,1410	19,1	0,0049	11,3	0,0056	0,1267	0,1515	0,0292	17,8	8,26	43,6	1,7	7,24	49,4
2	*Dü.*	vor	585	0,1000	47,5	0,0212	3,6	0,0018	315	0,1369	22,4	0,0057	7,6	0,0038	0,1230	0,1464	0,0234	15,9	8,66	—	2,7	7,30	42,7
		im	603	0,1030	47,0	0,0209	5,4	0,0027	326	0,1417	23,1	0,0059	7,6	0,0038	0,1266	0,1516	0,0250	16,5	8,54	—	4,1	7,29	43,6
3	*Br.*	vor	591	0,1010	52,8	0,0235	3,3	0,0016	308	0,1338	17,0	0,0043	9,2	0,0046	0,1261	0,1427	0,0166	11,5	9,19	43,0	1,5	7,28	44,9
		im	603	0,1030	52,1	0,0232	4,1	0,0020	311	0,1352	17,7	0,0045	10,1	0,0050	0,1282	0,1447	0,0165	11,4	8,32	41,6	1,8	7,22	52,0
4	*Kr.*	vor	576	0,0984	49,7	0,0221	3,4	0,0017	304	0,1321	23,1	0,0059	9,1	0,0045	0,1222	0,1425	0,0203	14,2	8,59	47,7	2,2	7,31	41,4
		im	588	0,1005	51,5	0,0230	4,2	0,0021	309	0,1343	22,1	0,0056	9,4	0,0047	0,1256	0,1446	0,0190	13,1	8,71	45,0	2,5	7,27	47,9
5	*Lu.*	vor	602	0,1028	58,5	0,0261	3,5	$0,0017_5$	342	0,1486	20,9	0,0053	8,75	0,0044	0,1306	0,1583	0,0277	17,5	9,47	45,3	2,1	7,33	42,5
		im	613	0,1047	59,0	0,0263	4,2	0,0021	344	0,1495	19,95	0,0051	10,3	0,0051	0,1331	0,1597	0,0266	17,3	9,42	34,6?	2,2	7,29	44,8
6	*Sche.*	vor	591	0,1010	60,5	0,0270	3,4	0,0017	322	0,1400	19 5	0,0050	10,6	0,0053	0,1297	0,1503	0,0205	13,6	9,14	35,0	1,6	7,32	40,0
		im	588	0,1005	60,8	0,0271	3,3	$0,0016_5$	321	0,1391	19,0	0,0049	10,7	$0,0053_5$	0,1292	0,1493	0,0201	13,4	8,95	35,5	1,5	7,29	43,5

Untersuchungen über den Stoffwechsel der Kohlenstoffverbindungen bei Bacillus pyocyaneus.

Von

J. Supniewski.

(Aus dem Institut für Serumforschung in Warschau.)

(Eingegangen am 10. November 1924.)

Der Bacillus pyocyaneus schöpft die Energie zu seinem Wachstum aus den organischen Verbindungen, die er in einfachere Bestandteile spaltet. Aus diesen braucht er zum Bau seines Körpers: den Kohlenstoff, Wasserstoff und zum Teil auch Sauerstoff. Selbstverständlich ist zum Wachstum dieser Bakterien auch Phosphor nötig, welcher durch Arsen nicht ersetzt werden kann, ferner Schwefel, ebenfalls nicht ersetzbar durch Selen und Tellur (*Aubel*). Magnesium- und Kaliumionen sind gleichfalls unbedingt nötig, wobei Magnesium durch Calcium, Strontium und Vanadium nicht ersetzbar ist; Natrium, nicht aber Rubidium und Cäsium, kann Kaliumionen vertreten. Die p_H, bei der das Wachstum stattfinden kann, beträgt 6,7 bis 8,8, am besten 7,6. Die Alkalisierung und Säuerung des Nährbodens während des Wachstums ist eine der wichtigsten Ursachen des Absterbens der Kultur.

Unsere Arbeit beschäftigt sich mit dem Stoffwechsel der einfachen organischen Verbindungen in den Kulturen des Bacillus pyocyaneus. Um die Veränderungen der zusammengesetzten Nährböden zu prüfen, haben wir auch die synthetischen Nährböden analysiert.

Technik. Der Nährboden wurde auf folgende Weise bereitet: 0,5 Proz. $NaCl$, 0,2 Proz. KH_2PO_4, 0,03 Proz. $MgSO_4$ und 0,001 Proz. $CaCl_2$. Der Nährboden wurde auf p_H mit n $NaOH$ eingestellt. Wir fügten zu dieser Flüssigkeit 0,5 Proz. der zu untersuchenden Kohlenstoffverbindungen und als Stickstoffquelle 0,5 Proz. $(NH_4)_2SO_4$. Der Nährboden wurde in 1-Liter-Flaschen sterilisiert und mit einer Emulsion von Bacillus pyocyaneus beimpft. Die Kulturen wurden bei 37° gehalten und aus ihnen täglich 10 ccm steril entnommen.

Mit den Proben wurden folgende Bestimmungen ausgeführt:

1. p_H mit der kolorimetrischen Methode (*Clark*).
2. Alkalireserve bis p_H 3,9 nach *van Slyke*.
3. Säurereserve durch Titration des Nährbodens mit n/10 H_2SO_4 bis p_H 9,0 (Phenolphthalein).
4. Aminostickstoff nach *Sörensen*.
5. Ammoniak mit MgO-Methode.
6. Gesamtstickstoff nach *Kjeldahl*.

Die Zahlen in den Protokollen zeigen die Zahl der Kubikzentimeter n/10 Lösungen an, die für die Titration von 10 ccm des entnommenen Nährbodens benutzt wurden.

I. Kohlensäure.

H. Braun und *Cahn-Bronner* beobachteten, daß sich der B. pyocyaneus auf den Nährböden mit Ammoniumcarbonat nur schwach entwickelt. Wir prüften diese Beobachtung bei einem Mineralnährboden mit 0,5 Proz. Ammoniumcarbonat nach. Auf diesem Nährboden wuchs der B. pyocyaneus schwach mit leichter Färbung. Am siebenten Tage wurde der Nährboden durchsichtig, bei p_H 8,4, was durch die Autolyse der Bakterien hervorgerufen wurde.

Protokoll 1.

Tage	p_H	A—3,9	NH_2	*Kjeldahl*	Tage	p_H	A—3,9	NH_2	*Kjeldahl*
1	7,8	3,0	3,6	—	9	8,6	3,4	3,4	—
2	7,8	3,1	3,5	—	10	8,6	3,4	3,4	—
3	7,8	3,3	3,3	—	11	8,6	3,4	3,4	—
4	8,0	3,3	3,2	—	12	8,6	3,4	3,4	—
5	8,2	3,4	3,1	—	13	8,6	3,4	3,4	—
6	8,2	3,4	3,1	—	14	8,6	3,4	3,4	—
7	8,4	3,5	3,2	—	15	8,6	3,4	3,4	—
8	8,6	3,4	3,4	—	16	8,8	3,4	3,4	3,4

Bemerkung zu Protokoll 1. Während 16 Tage wurde der Nährboden alkalisch bis p_H 8,8. Die Quantität des Aminostickstoffs vermindert sich bis zum siebenten Tage, was durch die Assimilation hervorgerufen wird. Vom siebenten Tage an vermehrt sich die Quantität des Aminostickstoffs durch die Autolyse der Bakterien. Die Bestimmungen des Gesamtstickstoffs am 16. Tage zeigen eine Verminderung. B. pyocyaneus oxydierte das Ammoniak bis zum freien Stickstoff, und die dabei entwickelte Energie wird zur Assimilation des Kohlenstoffs aus den Carbonaten gebraucht. Dieser Prozeß bedingt die Alkalisierung des Nährbodens durch die Befreiung der Alkalien von Carbonat.

II. Einbasische Fettsäuren.

Liot und *Goris* fanden, daß der B. pyocyaneus einbasische Fettsäuren von der Essigsäure bis zur Isocapronsäure verbrauchen kann.

Auf Nährböden mit Ameisensäure wächst der B. pyocyaneus nur schwach, auf höheren Fettsäuren kann er sich überhaupt nicht entwickeln. Wir benutzten zu unseren Untersuchungen Mineralnährböden mit 0,5 Proz. Ammoniumsulfat und 0,5 Proz. Natriumacetat. Der Gehalt an Essigsäure wurde nach *Fresenius* bestimmt[1]). Die Zahlen in der Tabelle zeigen n/10 Essigsäure, welche in 10 ccm des Nährbodens vorhanden sind.

Protokoll 2.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2	CH_3CO_2H	*Kjeldahl*
1	7,3	4,0	0,9	6,4	3,8	—
2	7,3	4,0	1,5	5,8	3,6	—
3	7,4	4,0	1,5	5,5	3,6	—
4	8,2	4,0	2,1	5,3	?	—
5	8,4	4,2	1,4	5,2	2,2	—
6	8,8	4,6	1,2	4,7	2,0	—
7	8,6	4,5	1,2	4,7	2,0	—
8	8,6	4,4	1,2	4,7	2,0	—
9	8,6	4,3	1,2	4,6	1,8	—
10	8,8	4,5	1,2	4,6	1,6	—
11	8,8	?	1,1	4,5	1,4	—
12	8,8	4,7	1,1	4,5	1,4	—
13	8,8	4,6	0,9	4,6	1,3	—
14	8,8	4,5	0,5	4,8	1,3	—
15	8,8	4,5	0,4	4,9	1,3	6,4

Bemerkung zu Protokoll 2. B. pyocyaneus entwickelte sich auf diesem Nährboden üppig, wobei eine dichte Haut auf der Oberfläche gebildet wurde. Der Nährboden zeigte eine Färbung sowie Entwicklung von aromatischen Körpern. Am zehnten Tage wird der Nährboden alkalisch mit nachfolgender Autolyse der Bakterien. Durch die Assimilation des Stickstoffs wird der Gehalt an Aminostickstoff geringer. Die Essigsäure wird langsam verbraucht und die Befreiung der freien Alkalien von den Acetaten verursacht die Alkalizunahme des Nährbodens. Wahrscheinlich oxydiert der B. pyocyaneus die Essigsäure über den Formaldehyd zur Ameisensäure und schließlich zum Kohlendioxyd.

III. Aldehyde.

Wir gebrauchten einen Mineralnährboden mit Ammoniumsalz und 0,13 Proz. Acetaldehyd. p_H 8,0. Nach 2 Tagen wurde der Nährboden undurchsichtig, sauer (p_H 7,0) und gab eine Spur der Denigés- und Schiffreaktion. Am vierten Tage zeigte der Nährboden p_H 6,6 und keine Aldehydreaktion. Wir benutzten auch Nährböden mit 0,3 Proz. Acetaldehyd, erzielten aber keine Entwicklung des B. pyocyaneus. Der B. pyocyaneus oxydierte zuerst den Acetaldehyd zu Essigsäure und dann zu Kohlendioxyd, was die Säuerung des Nährbodens erklärt.

[1]) *Beckurts*, Die Methoden der Maßanalyse S. 190. Vieweg, Braunschweig, 1913.

Er verhält sich also wie die Essigbakterien und Bakterien der Coli- sowie Buttersäuregruppe; denn für diese haben *Neuberg* und *Nord* nachgewiesen, daß sie intermediär Acetaldehyd erzeugen und dann sekundär verarbeiten.

IV. Ketone.

Wir benutzten Mineralnährböden mit 0,3 Proz. Aceton und 5 Proz. Ammoniumsulfat. Das Protokoll zeigt die Veränderungen des Nährbodens.

Protokoll 3.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2	CH_3CO_2
1	7,1	1,7	1,9	5,4	—
2	7,1	1,7	1,9	5,4	—
3	7,1	1,7	1,9	5,4	—
4	7,1	1,7	1,9	5,4	—
5	7,0	1,5	2,1	5,2	0,23 Proz.
6	7,0	1,4	2,2	4,8	—
7	6,8	1,3	2,3	4,6	—
8	6,6	1,0	2,6	4,5	0,18 Proz.

Bemerkung zu Protokoll 3. Während der ersten 4 Tage wurde keine Entwicklung festgestellt. Das Aceton verdunstete teilweise, so daß am fünften Tage nur 0,23 Proz. vorgefunden wurden. Bei dieser Konzentration konnte sich B. pyocyaneus entwickeln, am achten Tage hatte der Nährboden p_H 6,6 und 0,18 Proz. Aceton. Das Protokoll zeigt demnach, daß das Aceton langsamer verbraucht wird als der im vorigen Protokoll besprochene Aldehyd.

V. Alkohole.

Wir benutzten einen Mineralnährboden mit 0,5 Proz. Ammoniumsulfat und 1 Proz. Alkohol.

Protokoll 4.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2	*Kjeldahl*
1	7,6	1,9	1,9	6,7	—
2	7,6	1,9	1,9	6,7	—
3	7,2	1,7	2,2	6,4	—
4	6,8	1,6	2,5	5,9	—
5	6,8	1,6	2,9	5,4	—
6	6,8	1,6	3,0	5,4	—
7	6,6	1,5	5,1	5,4	—
8	6,6	1,5	3,1	5,4	—
9	6,6	1,4	2,9	5,4	—
10	6,6	1,4	3,0	5,4	—
11	6,6	1,3	2,9	5,4	6,7
12	6,6	1,3	2,9	5,4	—
13	6,4	1,3	3,0	5,2	—
14	6,4	1,4	2,9	5,2	—
15	6,4	1,3	2,9	5,2	—
16	6,4	1,4	2,9	5,3	—

Bemerkung zu Protokoll 4. B. pyocyaneus wächst üppig unter Farbstoffbildung. Während des Wachstums war die Aldehydreaktion *Denigès* positiv. Der Nährboden wurde sauer (p_H 6,4), es ist daher wahrscheinlich, daß die Bakterien den Äthylalkohol über Acetaldehyd bis zur Essigsäure und weiter bis zum Kohlendioxyd oxydieren.

VI. Einbasische Oxysäuren.

Die Untersuchungen von *Liot* und *Goris* zeigten, daß ausgenommen die Glyoxalsäure, diese Säuren für Bakterien einen Nährstoff darstellen. Wir benutzten 0,3 Proz. Ammoniumlactat. Die Milchsäure bestimmten wir nach *Fürth* und *Charnas*. Die vorletzte Reihe des Protokolls zeigt die Zahl der Kubikzentimeter n/10 J an, gebunden als Jodoform, das sich aus der Milchsäure, die in 10 ccm des Nährbodens enthalten war, bildete.

Protokoll 5.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2	$CH_3CHOHCO_2H$	*Kjeldahl*
1	8,0	4,5	1,0	5,6	8,3	—
2	7,9	4,3	1,2	5,3	6,6	—
3	7,8	4,0	1,5	4,6	1,8	—
4	7,8	4,3	1,6	4,5	1,6	—
5	7,8	5,3	1,8	3,7	1,5	—
6	7,6	6,1	2,0	3,6	1,5	—
7,6	7,6	6,1	2,0	3,4	0,5	—
8	7,6	6,1	2,0	3,3	0,1	—
9	7,6	6,1	2,0	2,7	0,0	—
10	7,6	6,1	1,8	2,7	—	—
11	7,7	7,5	1,6	2,7	—	—
12	7,8	7,5	1,6	2,7	—	—
13	7,9	7,5	1,4	2,6	—	5,6
14	8,4	7,7	1,2	2,6	—	—
15	8,6	7,8	0,5	2,6	—	—
16	8,8	8,0	0,3	3,5	—	—

Bemerkung zu Protokoll 5. Die Bakterien entwickelten sich üppig, unter Bildung einer grünen Haut. Der Nährboden säuerte sich bis zum neunten Tage, d. h. bis die Milchsäure gänzlich gespalten war. Dann alkalisierte er sich bis zum 16. Tage, bis p_H 8,8. Die Veränderungen an Aminostickstoff gehen dem Verschwinden der Milchsäure parallel. Das Destillat gab eine Aldehydreaktion, und am zehnten Tage gab der Nährboden nach der Reduktion mit Zinkstaub eine Milchsäurereaktion (*Denigès*). Man muß daher annehmen, daß der B. pyocyaneus die Milchsäure zu Brenztraubensäure oxydiert und dann über Acetaldehyd gemäß den *Neuberg*schen Befunden und weiter über Essigsäure bis zum Kohlendioxyd zerlegt. *Comber* und *Aubel* fanden während der Spaltung der Brenztraubensäure durch den B. pyocyaneus Milch- und Essigsäure. Die Milchsäure bildete sich durch die partielle Reduktion der Brenztraubensäure (*Neuberg* und *Kerb*). Auf anderen

Oxysäuren wächst der B. pyocyaneus gut, z. B. auf der Äpfelsäure, auf der Wein- und Citronensäure dagegen schwach. *Aubel* fand, daß B. pyocyaneus bei der Spaltung der Citronensäure Milch-, Essig- und Ameisensäure liefert.

VII. Mehrbasische Alkohole.

Wir benutzten Mineralnährböden mit 0,5 Proz. Ammoniumsulfat und 0,5 Proz. Glycerin. Das Glycerin wurde nach *Benedikt* bestimmt. Die Zahlen in der Reihe $C_3H_5(OH)_3$ zeigen die Zahl der Kubikzentimeter n/10 Kaliumpermanganat an, welche zur Bestimmung des Glycerins in 10 ccm des Nährbodens dienten.

Protokoll 6.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2	$C_3H_5(OH)_3$
1	7,8	1,9	1,0	3,7	28,5
2	7,8	1,9	1,0	3,5	28,5
3	8,0	1,9	1,0	3,3	26,3
4	7,6	1,8	1,1	3,2	25,4
5	7,4	1,7	1,2	3,2	24,6
6	7,2	1,6	1,3	3,2	23,8
7	7,0	1,4	1,5	2,5	22,4
8	6,8	1,2	1,7	2,4	22,0
9	6,6	1,1	1,8	2,4	21,0
10	6,6	1,2	1,7	2,4	—
11	6,6	1,3	2,0	2,0	17,5
12	6,4	1,6	3,3	2,7	—
13	6,4	1,6	2,3	1,8	—
14	6,4	1,6	2,4	1,8	16,7
15	6,4	1,6	2,4	1,8	—
16	6,3	1,6	2,5	1,7	—
17	6,0	1,5	2,5	1,7	—
18	5,8	1,0	2,5	1,7	—
19	5,4	0,5	2,6	1,5	—
20	5,0	0,2	2,7	1,4	14,4

Bemerkung zu Protokoll 6. Die Bakterien entwickelten sich gut unter Farbstoffbildung. Nach 20 Tagen war p_H des Nährbodens 5,0, und diese Säuerung beruhte auf nicht flüchtigen Fettsäuren, da p_H des Nährbodens sich nach dem Kochen nicht änderte. B. pyocyaneus spaltet das Glycerin nur langsam, nach 20 Tagen waren noch 50 Proz. vorhanden.

VIII. Kohlenhydrate.

Wir benutzten den Mineralnährboden mit 0,5 Proz. Ammoniumsulfat und 0,5 Proz. Glucose. Diese wurden nach der Methode von *Bertrand* bestimmt, die Zahlen in der Reihe $C_6H_{12}O_6$ zeigen die Zahl Kubikzentimeter n/10 Kaliumpermanganat an, welche zur Titration der Glucose in 10 ccm des Nährbodens benutzt wurden.

Protokoll 7.

Tage	p_H	A—3,9	NH_2	$C_6H_{12}O_6$	Tage	p_H	A—3,9	NH_2	$C_6H_{12}O_6$
1	8,4	2,6	6,1	14,5	10	7,0	1,7	5,5	8,4
2	8,4	2,6	6,1	14,5	11	7,0	1,6	5,5	6,0
3	7,8	2,5	6,1	14,0	12	6,8	1,4	5,5	3,5
4	7,6	2,4	6,0	13,8	13	6,7	1,4	5,5	2,0
5	7,4	2,3	5,8	12,5	14	6,7	1,3	5,5	1,8
6	7,4	2,3	5,8	11,4	15	6,7	1,3	5,5	0,6
7	7,3	2,2	5,8	9,5	16	6,7	1,2	5,3	0,0
8	7,3	2,0	5,7	9,0	17	6,6	1,2	5,0	—
9	7,0	1,8	5,5	8,5	18	6,6	1,3	4,9	—

Bemerkung zu Protokoll 7. Die Bakterien entwickelten sich üppig und verbrauchten in 16 Tagen die gesamte Glucose, wobei der Nährboden p_H 6,6 erreichte. Der Nährboden wurde nicht durchsichtig infolge fehlender Autolyse, die durch die saure Reaktion verhindert wurde. Der anfangs grünliche Nährboden wird bei p_H 6,6 gelblich. Das Maximum der grünen Färbung beobachteten wir bei p_H 7,7. Dem Schema der Kohlenhydratzersetzung von *Neuberg* folgend, nimmt *Aubel* die nachstehende Hexosespaltung an:

$$CH_2OHCHOHCHOHCHOHCHOH\underset{H}{CO} \rightarrow \begin{matrix} CH_3.CO \\ | \\ COH \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} CH_3CHOH \\ | \\ COOH \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} CH_3CO \\ | \\ COOH \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} CH_3CO \\ | \\ H \end{matrix} \nearrow CH_3CH_2OH \rightarrow \begin{matrix} CH_3CO \\ \\ OH \end{matrix}$$

$$\downarrow$$

$$CH_3COOH \rightarrow (HCOH \rightarrow HCOOH \rightarrow CO_2).$$

Zusammenfassend ergibt unsere Arbeit, daß der B. pyocyaneus sehr leicht den Kohlenstoff aus den aliphatischen Verbindungen assimilieren kann, wobei er sie bis zu den einfacheren Verbindungen spaltet. Der B. pyocyaneus kann auch den Kohlenstoff von Kohlendioxyd assimilieren, indem er die Energie, welche durch die Oxydation entwickelt wird, benutzt. *Liot* und *Goris* zeigten, daß die Fettverbindungen, welche mehr als 6 Atome Kohlenstoff in einem Molekül enthalten, im allgemeinen durch den B. pyocyaneus nicht gespalten werden können, ebensowenig wie die Verbindungen, die eine solche Kette haben. Bei ungesättigten Säuren spielt die Stereoposition eine große Rolle. *Liot* zeigte, daß der B. pyocyaneus die Transform benötigt. Die Nachbarschaft der Gruppe hat somit eine Bedeutung. Die Verbindungen, welche die Carboxyl- und Hydroxylgruppen in der Nähe aufweisen, sind nur schwer spaltbar (Oxalsäure, Weinsäure, Ameisensäure).

Die wichtigste Ursache der Selbstvergiftung der Kultur ist die Säuerung und die Alkalisierung des Nährbodens. Die Grenzen des Wachstums schwanken für B. pyocyaneus zwischen p_H 6,6 und 8,8. Die Säuerung entsteht durch das Freiwerden der Carboxylgruppen. die sich aus den Alkohol-, Keton- und Aldehydgruppen bilden können.

Nährböden mit diesen Verbindungen werden daher sauer. Wenn der Nährboden Verbindungen mit Carboxylgruppen enthält, so werden sie durch die Oxydation vernichtet, was die Alkalisierung des Nährbodens zur Folge hat (*Neuberg* und *Karczag*). Durch Assimilierung der Aminogruppen kann der Nährboden sauer werden. Beim großen Puffer reguliert der B. pyocyaneus die p_H des Nährbodens, wobei er bestrebt ist, die für ihn optimale p_H 7,6 zu erreichen.

Literatur.

Aubel, C. r. Acad. de Scienc. **74**, 574, 1921; **173**, 179 und 1493, 1921; **174**, 332, 1921. — *Aubel* und *Colin*, C. r. Soc. de Biol. **75**, 25, 1915. — *Braun* und *Cahn-Bronner*, diese Zeitschr. **131**, H. 3/4, S. 226—272, 1922. — *A. Constantino*, Arch. di scienc. biol. **3c**, H. 3/4, S. 263, 1921. — *Forster* und *Lauen*, Journ. of bact. **112**, 211, 1921. — *Franzen* und *H. Steppuhn*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **44**, 2915, 1911. — *Franzen*, *H. Steppuhn*, *Greve*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **120**, 19, 1911; **127**, 129, 1914; **133**, 226, 1915. — *C. Gazzetti*, Centralbl. f. Bakt. Org. **60**, 588, 1919. — *Gessard*, C. r. soc. de biol. **72**, 795, 1918; Ann. de Inst. Pasteur. **33**, 241, 1919. — *v. Grab*, diese Zeitschr. **123**, H. 1/4, S. 69, 1923. — *Goris* und *Liot*, C. r. soc. de biol. **173**, 575, 1923. **174**, 922, 1923. — *Liot*, Ann. de Inst. Pasteur **37**, 234, 1923. — *Neuberg* und *Hildesheimer*, diese Zeitschr. **31**, 170, 1910; *Neuberg* und *Karczag*, diese Zeitschr. **36**, 68, 1911; *Neuberg* und *Nord*, diese Zeitschr. **96**, 133 und 158, 1919; *Neuberg*, Monogr. Jena 1913; diese Zeitschr. **67**, 90, 1914. — *Petersen* und *Fred*, Journ. of Biochem. **53**, Nr. 1, S. 111, 1921. — *Robinson*, ebendaselbst **53**, 125, 1921.

Untersuchungen über den Stoffwechsel der Stickstoffverbindungen in den Kulturen von Bacillus pyocyaneus.

Von

J. Supniewski.

(Aus dem Institut für Serumforschung in Warschau.)

(Eingegangen am 10. November 1924.)

Aubel, *Liot* und *Goris* gaben an, daß der Bacillus pyocyaneus aus den Ammoniumsalzen, Alanin, Asparagin, Glutamin und Glutaminsäure den Stickstoff leicht assimiliert, dagegen schwer aus Cystein, Leucin und zyklischen Aminosäuren. Aus den aliphatischen Aminen und Amiden, aus dem Glykokoll und dem Harnstoff kann Stickstoff nur assimiliert werden, wenn gleichzeitig eine gute Kohlenstoffquelle, z. B. Glucose, vorhanden ist. Die in Frage kommenden Stickstoffverbindungen wurden zu den in der ersten Mitteilung besprochenen synthetischen Nährböden zugesetzt. Die allgemeine Technik ist dieselbe wie in der ersten Mitteilung.

I. Salpetersäure.

Wasserberg und *Wolff* fanden, daß der B. pyocyaneus Nitrate und Nitrite zu freiem Stickstoff reduzieren kann. *Grimbert* untersuchte dieses Phänomen näher. Wir verwandten einen Mineralnährboden mit 0,5 Proz. Kaliumnitrat und 0,5 Proz. Natriumlactat. Die Salpetersäure bestimmten wir nach *Devara*[1]). Die Zahlen in der Rubrik NO_3 zeigen die Zahl der Kubikzentimeter n/10 Schwefelsäure, welche zur Titration von 10 ccm des Nährbodens benutzt wurden. Die Nitrite wurden nach *Winkler* bestimmt[2]). Die Zahlen in der Rubrik NO_2

---

[1]) *Treadwell*, Lehrbuch der analytischen Chemie, II, S. 384. Leipzig, Deuticke, 1922.

[2]) *Beckurts*, Die Methoden der Maßanalyse, S. 190. Braunschweig, Friedr. Vieweg & Sohn, Akt.-Ges., 1913.

zeigen die Zahl der Kubikzentimeter n/10 Natriumthiosulfat, welche zur Titration von 10 ccm des Nährbodens benutzt wurden. Die Veränderungen in dem Nährboden zeigt das Protokoll 1.

Protokoll 1.

Tage	p_H	A—3,9	NO_3	NO_2	NH_2	*Kjeldahl*
1	7,8	4,0	5,0	0,0	0,0	0,0
2	7,8	4,0	4,8	0,2	0,0	0,0
3	8,9	7,9	3,0	2,0	0,0	0,1
4	9,0	10,0	0,0	2,0	—	0,2
5	9,4	11,0	—	0,2	—	0,2
6	9,6	12,0	—	—	—	—
7	9,6	12,0	—	—	—	0,36
8	9,7	12,0	—	—	—	—
9	9,6	12,0	—	—	—	—
10	9,6	12,0	—	—	—	—
11	9,6	12,0	—	—	—	—
12	9,6	12,0	—	—	—	—
13	9,6	12,0	—	—	—	—
14	9,4	12,0	—	—	—	0,36

Bemerkung zum Protokoll 1. Das Wachstum auf diesem Nährboden ist üppig, die Alkaleszenz erreicht nach 6 Tagen p_H 9,6. In dieser Zeit werden alle Nitrate gespalten bis zum freien Stickstoff, der unter Blasenbildung entweicht. Einige Stunden nach der Impfung lassen sich Nitrite feststellen (*Ilosvay*), welche ihr Maximum nach 3 bis 4 Tagen erreichen und nach 6 Tagen bereits verschwinden. Ammoniak ließ sich während des Wachstums nicht nachweisen. Stickstoff aus den Nitraten wird nur in geringer Menge assimiliert. Der größte Teil der Nitrate wird in Nitrite umgewandelt und schließlich bis zum freien Stickstoff gespalten. Die aus den Nitraten frei gewordenen Alkalien bilden mit der Atmungskohlensäure der Bakterien Kaliumcarbonat, das den Nährboden alkalisiert und die Zunahme der Alkalireserve hervorruft. Meine späteren Untersuchungen bestätigten, daß der B. pyocyaneus in den Nährböden, die Salpeter enthalten, auch unter anaeroben Verhältnissen gedeihen kann, indem der Sauerstoff vom Salpeter assimiliert wird.

II. Harnstoff.

M. Sandberg, Swoboda und *Dieter* fanden, daß Hefe den Stickstoff aus dem Harnstoff nicht assimilieren kann. *Long* fand dasselbe beim B. tuberculosus; *Aubel, Liot* und *Goris* fanden, daß der B. pyocyaneus Stickstoff aus dem Harnstoff in Anwesenheit einer Kohlenstoffquelle assimilieren kann. Wir benutzten einen Mineralnährboden mit 0,5 Proz. Harnstoff und 0,5 Proz. Natriumlactat. Der Nährboden enthielt etwas Ammoniak, das während der Sterilisation aus dem Harnstoff entstanden ist.

Protokoll 2.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2	NH_3	Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2	NH_3
1	7,6	11,6	1,6	1,6	0,9	7	9,6	29,0	— 3,2	10,4	9,3
2	8,2	12,5	0,8	1,2	1,2	8	9,6	30,0	— 3,5	10,5	9,6
3	8,6	13,0	0,3	1,2	1,2	9	9,6	31,0	— 3,7	11,3	11,2
4	8,8	14,0	0,1	0,9	0,9	10	9,6	32,2	— 4,0	11,4	11,4
5	8,8	14,1	0,1	1,5	1,5	11	9,8	33,0	— 4,5	11,5	11,5
6	9,8	29,0	— 3,2	10,0	9,0						

Bemerkung zum Protokoll 2. Nach 4 Tagen wurde der Nährboden alkalisch bis p_H 8,8. Ammoniak, das sich im Nährboden befand, wurde assimiliert. Am sechsten Tage entstanden große Mengen Ammoniak, das den Nährboden bis p_H 8,8 alkalisierte. Weitere Untersuchungen zeigten dann, daß diese Vermehrung des Ammoniaks durch die Urease hervorgerufen wurde, welche durch die Autolyse der Bakterien bei p_H 8,8 aus den Bakterien entstand. Der Harnstoff wird durch die Urease zum Ammoniumcarbonat gespalten, aus dem dann die Bakterien den Stickstoff assimilieren können. *Goris* fand die Urease in den Pilzen und *Jacoby* im B. proteus. Unsere Untersuchungen zeigten, daß die Urease in älteren Kulturen vorhanden war, unabhängig vom p_H des Nährbodens (6,6 bis 8,8). Frisch hergestellte Bakteriensuspensionen enthalten dieses Ferment nicht. Wenn wir aber den Nährboden mit einer älteren Bakterienkultur impfen, dann wächst der B. pyocyaneus auf einem Nährboden, welcher allein den Harnstoff enthält, da die Urease, welche in den Nährboden hineinkommt, den Harnstoff zum Ammoniumcarbonat spaltet, auf dem die Bakterien wachsen können. Das Protokoll 3 gibt uns die entsprechenden Belege.

Protokoll 3.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2	NH_3	Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2	NH_3
1	7,2	1,4	0,8	0,3	0,3	8	8,8	2,4	0,2	1,5	—
2	7,4	1,6	0,7	0,5	—	9	8,8	2,4	0,2	1,6	—
3	7,7	1,8	0,7	0,9	—	10	8,8	2,5	0,1	1,7	—
4	7,7	1,8	0,6	0,9	—	11	8,9	2,5	0,0	1,8	1,8
5	7,8	1,9	0,5	1,0	—	12	8,9	2,5	0,0	1,8	—
6	8,0	2,0	0,4	1,2	—	13	9,0	2,5	0,0	1,7	—
7	8,6	2,4	0,3	1,4	—						

III. Glykokoll.

Liot und *Goris* zeigten, daß sich der B. pyocyaneus auf einem Nährboden mit Glykokoll nur dann entwickeln kann, wenn er außerdem eine Kohlenstoffquelle enthält. Unsere Untersuchungen bestätigten, daß sich der B. pyocyaneus auf Glykokoll allein nicht entwickeln kann. Wir benutzten einen Mineralnährboden mit 0,5 Proz. Glykokoll und als Kohlenstoffquelle 0,5 Proz. Glucose.

Protokoll 4.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	$C_6H_{12}O_6$	NH_2	NH_3
1	8,6	3,2	0,2	15,1	5,7	0,0
2	8,6	3,3	0,5	12,3	5,3	0,1
3	8,0	3,0	1,3	8,4	5,2	0,2
4	6,4	2,6	2,4	2,8	5,0	0,2
5	6,3	3,0	1,9	1,5	4,8	0,2
6	6,4	3,5	1,0	0,8	4,5	0,4
7	6,5	4,0	0,9	0,0	4,3	0,8
8	6,7	4,5	0,7	—	4,2	1,3
9	6,6	6,5	0,8	—	4,2	3,3
10	7,0	6,9	0,6	—	4,2	3,2
11	8,2	7,0	0,5	—	4,0	3,1
12	8,4	7,3	0,4	—	4,0	3,0
13	8,6	7,4	0,2	—	3,8	3,4
14	8,8	7,5	0,1	—	3,6	3,4

Bemerkung zum Protokoll 4. Die Bakterien wuchsen auf diesem Nährboden sehr gut bis zum siebenten Tage, an welchem die Spaltung der Glucose beendet war. Mit der Glucosespaltung ging die Assimilierung des Stickstoffs aus dem Glykokoll einher, wobei sich eine Spur Ammoniak bildete. Vom siebenten Tage an entwickelte sich B. pyocyaneus auf Kosten des Glykokolls, das unter Ammoniakbildung gespalten wurde, wobei sich der Nährboden bis p_H 8,8 alkalisierte. Glucose diente dabei als „primum movens“ der Spaltung, und erst wenn die Glucose verschwunden ist, wird der Kohlenstoff vom Glykokoll assimiliert.

IV. Asparagin.

Wir benutzten einen Mineralnährboden mit 0,5 Proz. Ammoniumsulfat und 0,5 Proz. Asparagin. Die Veränderungen des Nährbodens zeigt uns das Protokoll 5.

Protokoll 5.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2	NH_3
1	8,4	5,0	0,8	7,1	5,4
2	8,6	5,3	0,8	7,2	—
3	8,6	6,8	1,2	8,6	—
4	8,6	9,5	1,4	10,2	9,6
5	8,8	10,4	1,0	10,4	—
6	8,8	10,7	1,0	10,4	10,4
7	8,8	12,4	0,5	10,5	—
8	8,8	12,4	0,1	10,0	10,0

Bemerkung zum Protokoll 5. Die Bazillen entwickelten sich üppig unter Farbstoffbildung, sie alkalisierten den Nährboden bis p_H 8,8 am fünften Tage. Am vierten Tage entstand eine plötzliche Vermehrung des Aminostickstoffs und parallel damit des Ammoniaks. Am sechsten Tage wurde der ganze Aminostickstoff in Ammoniak gespalten. Wir

beobachteten somit die bei vielen Bakterien und beim B. pyocyaneus auch von *Aubel* beschriebene Desamidation der Carbamidogruppen des Asparagins. *Arnaud* und *Charrin* fanden, daß dieser Prozeß von ureaseähnlichen Fermenten abhängig ist. Am fünften Tage fanden wir Äpfelsäure (Jodoform-, β-Naphthol- und Palladiumchloridreaktion), Bernsteinsäure wurde nicht festgestellt. Im Destillat wurde Acetaldehyd gefunden (Jodoform-, Denigés- und Schiffreaktion). *Aubel* fand in den Nährböden mit oben erwähntem Zusatz Fumar-, Malon-, Äpfel-, Propion- und Ameisensäure. Nach *Neuberg* und *Aubel* kann man sich die Spaltung des Asparagins folgendermaßen vorstellen:

$$\begin{matrix} CHNH_2COOH & & CHNH_2COOH \\ | & \rightarrow & | \\ CH_2CONH_2 & & CH_2COONH_4 \end{matrix}$$

$$\rightarrow \begin{matrix} COCOOH \\ | \\ CH_2COOH \end{matrix} \begin{matrix} \nearrow \begin{matrix} CHOHCOOH \\ | \\ CH_2COOH \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} CH_2COOH \\ | \\ CH_2COOH \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} CH_3 \\ | \\ CH_2COOH \end{matrix} \\ \searrow \begin{matrix} CHCOOH \\ \| \\ CHCOOH \end{matrix} \rightarrow HCOOH \end{matrix}$$

V. Cyanverbindungen.

Patty zeigte, daß sich in den Kulturen mit Eigelb bei p_H 5,4 bis 5,8 HCN bildet. Wir benutzten einen Mineralnährboden mit 1 Proz. Ammoniumrhodanat, welches nach *Volhard* bestimmt wurde. Die Schwefelsäure wurde nach *Raschig*[1]) bestimmt. Die Zahlen in dem Protokoll in den Rubriken CNS und SO_4 zeigen die Zahl der Kubikzentimeter n/10 in 10 ccm des Nährbodens.

Protokoll 6.

Tage	p_H	A−3,9	A−9,0	NH_2	CNS	SO_4
1	7,6	2,7	1,0	7,0	7,0	1,1
2	7,4	2,6	1,4	7,0	7,0	—
3	7,3	2,5	1,4	6,9	6,8	—
4	7,3	2,5	?	6,8	?	—
5	7,3	2,5	1,4	6,7	6,8	—
6	7,3	2,4	1,4	6,7	6,8	—
7	7,3	2,3	1,4	6,7	?	1,2

Bemerkung zum Protokoll 6. Die Bazillen entwickelten sich schwach, wobei nur unbedeutende Verminderung des Stickstoffs der Rhodan- und Schwefelsäure festzustellen war. Der zweite Mineralnährboden enthielt 0,3 Proz. Kaliumcyanat und 0,5 Proz. Natriumacetat. Die Cyansäure bestimmten wir, indem wir sie in Ammoniak durch Hydrolyse mit 10 Proz. HCl umwandelten. Die Veränderungen des Nährbodens zeigt uns das Protokoll 7.

[1]) Zeitschr. f. angew. Chem. 1903, S. 617 u. 818.

Protokoll 7.

Tage	p_H	A—3,9	A—9,0	NH_2	NH_3	CNO
1	6,8	7,0	1,5	0,2	0,2	1,5
2	7,8	7,2	0,3	0,7	—	0,8
3	8,2	7,4	0,2	1,5	1,5	0,0
4	8,4	7,5	0,1	1,3	—	—
5	8,4	7,5	0,1	1,1	1,1	—
6	8,6	7,6	0,0	0,5	—	—
7	8,8	7,8	—	0,5	0,5	—

Bemerkung zum Protokoll 7. Auf diesem Nährboden entwickeln sich die Bakterien gut, aber unter schwacher Farbstoffbildung. In 2 Tagen ging die gesamte Cyansäure in Ammoniak über, wobei letzteres durch die Bakterien assimiliert wurde. Das hatte die Alkalisierung des Nährbodens bis p_H 8,8 zur Folge.

Der B. pyocyaneus assimiliert demnach den Stickstoff am leichtesten aus den Ammoniumgruppen. Alle anderen Stickstoffverbindungen müssen zuerst durch die Hydrolyse der Amino- und Amidoverbindungen, durch Reduktion der Nitrate und der Nitrite in diese Form umgewandelt werden. Durch diese Prozesse wird die Alkalisierung des Nährbodens bewirkt. Wir bestätigen somit die Angaben von *Liot*, *Goris*, *Aubel*, *Comber*, daß der B. pyocyaneus auf den Amiden und Aminen allein nicht wachsen kann und daß zur Desamidation eine Kohlenstoffquelle als „primum movens" notwendig ist. *Liot* zeigte, daß auf dialysiertem Serumeiweiß sich der B. pyocyaneus nicht entwickeln kann und daß somit die Anwesenheit dialysabler Bestandteile des Serums notwendig ist. Der B. pyocyaneus entwickelt sich zuerst auf diesen, wobei proteolytische Fermente gebildet werden, die das Eiweiß bis zu Aminosäuren spalten. Diese letzteren dienen dann als Quelle späterer Entwicklung des B. pyocyaneus.

Literatur.

Aubel, Recherches biochimiques sur la nutricion du b. pyocyanique Launier Caen Paris 1921. — *Colin*, C. r. Soc. de Biol. **124**, 790, 1913; **128**, 174, 1915. — *Braun* und *Cahn-Bronner*, diese Zeitschr. **81**, H. 3/4, S. 226, 272, 1922. — *Dieter*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**, 281, 1922. — *Franzen*, ebendaselbst **113**, 52, 1909. — *Liot*, Ann. Inst. Pasteur. **37**, 234, 1923. — *Neuberg* und *Cappezzuoli*, diese Zeitschr. **18**, 424, 1909; *Neuberg*, diese Zeitschr. **67**, 90, 1914. — *Patty*, Journ. of Inf. Diss. **29**, 73, 77, 1921. — *Sasaki*, *Osuka*, diese Zeitschr. **39**, 208, 1912. — *Sandberg*, ebendaselbst **128**, 76, 1922.

Beiträge zur Biochemie der Avitaminosen. V.

Von

Alexander Palladin.

Untersuchungen über den Stoffwechsel bei avitaminös ernährten Kaninchen.

Von

Anna Kudrjawzewa.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium des medizinischen Instituts zu Charkow.)

(Eingegangen am 21. Oktober 1924.)

Es liegt jetzt eine ganze Reihe von Arbeiten vor über den Stoffwechsel bei solchen Arten der Avitaminose der Tiere, wie Skorbut der Meerschweinchen und Affen, Polyneuritis der Tauben, Rachitis der jungen Hunde und Avitaminose der Hunde. Aber zugleich ist die Frage nach der Wirkung des Vitaminhungers auf den Stoffwechsel der Kaninchen noch ganz unbeantwortet geblieben, und es ist nicht einmal der Bedarf dieser Tiere an den Vitaminen der verschiedenen Gruppen festgestellt worden.

So haben *Holst* und *Fröhlich*[1]) darauf hingewiesen, daß die Abwesenheit des Vitamins *C* im Futter bei Kaninchen, wie auch bei Meerschweinchen Skorbut erzeugt. *Schaumann*[2]) und *Miyakichi*[3]) sahen Beriberisymptome bei Kaninchen, nachdem ersterer sie mit Mais und letzterer mit Reis gefüttert haben. *Findlay*[4]) deutet auf das Auftreten der Rachitis bei Kaninchenjungen, wenn das Futter des Muttertieres während der Schwangerschaft und des Säugens keine Vitamine *A* und *C* enthalten hatte. Zugleich sahen *Nelson* und *Lamb* Keratomalacie bei Kaninchen, welche mit künstlichen Gemischen ernährt wurden, die keine Vitamine *A* und *C* enthielten; diese Erscheinung verschwand, wenn Butter dem Futter beigegeben wurde.

Die vorliegende Untersuchung wurde vorgenommen, um die Rolle der Vitamine bei der Regelung der Stoffwechselprozesse der Kaninchen aufzuklären.

Unsere Untersuchungen zeigten vorerst, daß die Anwesenheit der Vitamine der Gruppe A und C im Futter erwachsener Kaninchen

---

[1]) *Holst* und *Fröhlich*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **72**, 1, 1912.
[2]) *Schaumann*, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **14**, 8, 1910.
[3]) *Miyakichi*, Trans. Japanes. pathol. Soc. **11**, 1, 1921.
[4]) *Findlay*, Journ. of Pathol. and Bact. **26**, 1, 1923.

nicht unbedingt nötig ist, da das Wohlbefinden der Tiere nicht leidet und sie von ihrem Gewicht nichts verlieren, wenn man sie monatelang ausschließlich mit Hafer füttert (Hafer enthält keine Vitamine der oben genannten Gruppen).

Nur eine vollständige Avitaminose, d. h. das Fehlen auch der Vitamine der Gruppe B in der Nahrung, bringt eine heftige Störung der Stoffwechselprozesse mit sich, an der die Tiere zugrunde gehen.

Als solches vitaminloses Futter diente uns entweder polierter Reis oder Hafer, welcher 3 Stunden lang bei 140° unter Druck von 3 Atm. im Autoklaven erhitzt wurde, um die Vitamine der Gruppe B, welche der Hafer reichlich enthält, zu zerstören. Reis wurde ebenfalls eine halbe Stunde lang im Autoklaven bei 120° erwärmt, weil nach *Abderhaldens* Angaben sogar polierter Reis Spuren des Vitamins B enthält. Als Versuchstiere dienten erwachsene Kaninchen, die in gewöhnlichen Stoffwechselkäfigen gehalten wurden. Diese Käfige waren mit doppeltem Boden versehen, damit die Tiere ihren Kot nicht fressen konnten. Die Lebensdauer der Kaninchen betrug bei Fütterung mit weißem Reis 1½ bis 3 Monate. Bei Fütterung mit im Autoklaven behandeltem Hafer lebten die Kaninchen länger, von 2 bis 6 Monate, je nach ihrem Alter und ihrer Individualität.

Während der letzten 1 bis 2 Wochen verloren die Kaninchen den Appetit, saßen unbeweglich in einer Ecke des Käfigs in einer charakteristischen gebeugten Lage und verließen diese Lage höchst ungern. Wenn sie sich regten, so sprangen sie nicht, sondern bewegten die Hinterbeine langsam und ungeschickt; dabei schien die Bewegung der Gelenke erschwert zu sein. Bei der Sektion fand man oft Blutergüsse in den Gelenken, in den Muskeln des Bauches und der Extremitäten. Die inneren Organe waren makroskopisch normal, nur die Nebennieren vergrößert und ihre innere Schicht erweicht. Bei unseren Versuchen sahen wir also weder Symptome des typischen experimentellen Skorbuts noch der Beriberi.

Nachdem wir festgestellt hatten, daß die Anwesenheit der Vitamine der Gruppe B im Futter unbedingt nötig ist, studierten wir den Einfluß des vitaminlosen Futters auf die Stoffwechselprozesse dieser Tiere. Zu diesem Zwecke veranstalteten wir zwei Versuchsreihen.

1. Versuchsreihe.

In der ersten Versuchsreihe wurde der Vitaminhunger der Kaninchen durch Ernährung mit weißem Reis hervorgerufen. Das Kontrollfutter bestand, wie gewöhnlich, aus Hafer und Rüben. Bei solcher Versuchsanordnung untersuchten wir den Kohlenhydrat-, Stickstoff-, Mineral- und Lipoidstoffwechsel.

Kohlenhydratstoffwechsel.

Um den Einfluß der Fütterung mit Reis auf den Kohlenhydratstoffwechsel bei Kaninchen zu erforschen, bestimmten wir den Zucker- und Amylasegehalt des Blutes. Der Zuckergehalt des Blutes wurde nach *Bangs* Mikromethode alle 2 Tage während der ganzen Versuchsdauer bestimmt. Die Amylasebestimmung führten wir nach der von *Slovtzow* veränderten Methode von *Wohlgemuth* aus; dabei wurden die Bestimmungen nur am Ende des Versuchs vorgenommen, als die Tiere getötet wurden.

Die Bestimmungen erwiesen, daß die Fütterung der Kaninchen mit Reis einen bestimmten Einfluß auf den Kohlenhydratstoffwechsel ausübt (s. Tabellen I und II). In den ersten 7 bis 10 Tagen nach Beginn der Fütterung mit Reis verminderte sich der Gehalt an Zucker unbedeutend, bis zu 0,077 bis 0,074 Proz.; dann stieg er allmählich, und gegen Ende des ersten Monats hatte die Hyperglykämie einen bedeutenden Grad erreicht (0,2 bis 0,21 Proz.).

Tabelle I.
Kohlenhydratstoffwechsel.

Datum 1922	Gewicht des Kaninchens g	Blutzucker Proz.	Futter
5. VI.	2010	0,099	Hafer und Rüben
6. VI.	2019	0,097	
8. VI.	2008	0,102	
9. VI.	2015	0,100	
11. VI.	2012	0,095	Reis
14. VI.	2000	0,082	
17. VI.	1989	0,093	
20. VI.	1990	0,103	
23. VI.	1971	0,124	
26. VI.	1910	0,109	
29. VI.	1870	0,141	
2. VII.	1903	0,167	
5. VII.	1888	0,189	
11. VII.	1845	0,195	
14. VII.	1862	0,191	
17. VII.	1854	0,189	
20. VII.	1833	0,163	
23. VII.	1837	0,142	
26. VII.	1828	0,129	
29. VII.	1813	0,111	
1. VIII.	1809	0,096	
4. VIII.	1773	0,083	
7. VIII.	1750	0,087	
10. VIII.	1685	0,079	
13. VIII.	1621	0,071	
16. VIII.	1479	0,067	

Tabelle II.
Kohlenhydratstoffwechsel.

Datum 1922	Gewicht des Kaninchens g	Blutzucker Proz.	Futter
5. VI.	1950	0,101	Hafer und Rüben
6. VI.	2003	0,104	
8. VI.	2010	0,109	
9. VI.	2008	0,102	
11. VI.	2020	0,097	Reis
14. VI.	2053	0,097	
17. VI.	2059	0,086	
20. VI.	1987	0,071	
23. VI.	1950	0,089	
26. VI.	1907	0,109	
29. VI.	1905	0,118	
2. VII.	1863	0,123	
5. VII.	1829	0,119	
8. VII.	1814	0,143	
11. VII.	1742	0,187	
14. VII.	1703	0,193	
17. VII.	1668	0,191	
20. VII.	1657	0,173	
23. VII.	1650	0,182	
26. VII.	1623	0,107	
29. VII.	1540	0,143	
1. VIII.	1510	0,113	
4. VIII.	1502	0,094	
7. VIII.	1490	0,079	
10 VIII.	1443	0,073	
13. VIII.	1400	0,069	
14. VIII.	1398	0,071	

Später fing der Blutzucker wieder zu sinken an, und zur Zeit des Todes des Kaninchens hatten wir keinen normalen Zuckergehalt des Blutes, sondern eine Hypoglykämie von 0,079 bis 0,067 Proz. (Der normale Zuckergehalt des Blutes schwankt bei Kaninchen zwischen 0,093 bis 0,108 Proz.) Dabei fehlte während der ganzen Versuchsdauer Zucker im Harn. Der Amylasegehalt des Blutes am Ende des Versuchs wurde bedeutend kleiner als normal, nämlich $D_{24\,h}^{38^0} = 20$; $-D_{24\,h}^{38^0} = 16$. (Normalerweise fanden wir im Blute erwachsener Kaninchen $D_{24\,h}^{38^0} = 40$.)

Folglich *bewirkt die Fütterung der Kaninchen mit Reis 1. eine Herabsetzung der diastatischen Kraft des Blutes; 2. anfangs eine unbedeutende Hypoglykämie, welche später einer Hyperglykämie Platz macht und endlich, vor dem Tode des Tieres, in eine Hypoglykämie übergeht.*

Stickstoffstoffwechsel.

Beim Studium des Stickstoffstoffwechsels bestimmten wir den Gehalt des Harns an Gesamtstickstoff, Harnsäure, Kreatinin und Kreatin und auch den Kreatingehalt der Muskeln. Der Stickstoff wurde nach der von *Gulick*[1]) veränderten Methode von *Folin* und *Farmer* bestimmt, die Harnsäure nach *Folin* und *Schaffer*; Kreatinin und Kreatin nach *Folin* und *Morris*[2]) und das Muskelkreatin nach der von *Alexander Palladin*[3]) veränderten Methode von *Riesser*.

Unsere Bestimmungen zeigten uns, daß die Fütterung der Kaninchen mit Reis die verschiedenen Momente des Stickstoffstoffwechsels bald ziemlich stark, bald weniger bedeutend beeinflußt. Im allgemeinen verringert sich die Stickstoffausscheidung und es gibt normale oder erhöhte Werte nur am Ende des Versuchs. So zeigt Tabelle III, daß der Stickstoffgehalt für 24 Stunden, auf 1 kg Körpergewicht berechnet, durchschnittlich während der Kontrollperiode 272 mg ergibt. Nachdem man angefangen hatte, die Kaninchen mit Reis zu füttern, verminderte sich der Stickstoffgehalt um einiges und betrug in den ersten 20 Tagen des Versuchs durchschnittlich 230 bis 254 mg. Später stieg die Stickstoffausscheidung, und während der nächsten 20 Tage des Versuchs betrug sie 319 mg, ja sogar 376 mg.

Manchmal waren die Werte der relativen Stickstoffausscheidung am Ende des Versuchs sogar noch höher als die Kontrollwerte. So schied (s. Tabelle IV) das mit Hafer und Rüben gefütterte Kaninchen durchschnittlich 479 mg N aus, und bei ausschließlicher Fütterung mit Reis waren die mittleren Werte für jede 10 Tage des Versuchs 412, 268, 341 und 427 mg. Also zeigt die relative Stickstoffausscheidung bei Fütterung der Kaninchen mit weißem Reis eine geringe Abweichung von der Norm.

---

[1]) *Gulick*, Journ. of biol. Chem. **18**, 541, 1914.

[2]) *Folin* und *Morris*, ebendaselbst **17**, 469, 1914.

[3]) *Alexander Palladin* und *Kudrjawzewa*, diese Zeitschr. **133**, 89, 1922.

Die *Ausscheidung der Harnsäure* unterliegt bei der Fütterung der Kaninchen mit Reis bestimmten Veränderungen; *in den ersten 10 bis 12 Tagen steigert sich die Ausscheidung der Harnsäure beträchtlich, dann sinkt sie fast bis zur Norm und steigt wieder am Ende des Versuchs.*

Tabellen III und IV zeigen uns, daß während der Kontrollperiode 4,5 bis 5,5 mg des Harnsäurestickstoffs im Harn ausgeschieden wurden, auf 1 kg des Körpergewichts des Tieres berechnet. In den 10 ersten Tagen des Versuchs wurden täglich 6,6 bis 11,8 mg des Harnsäurestickstoffs ausgeschieden; dann waren es 4,7 bis 6,6 mg, 5,0 bis 7,4 mg, und endlich in den letzten Tagen des Versuchs durchschnittlich 6,9 bis 8,9 mg.

Wenn wir den Stickstoff der Harnsäure in Prozenten des Gesamtstickstoffs ausdrücken, so erhalten wir ähnliche Resultate. Also steigt der Harnsäurewert im Harn der mit Reis gefütterten Kaninchen am Anfang des Versuchs, sinkt dann fast bis zur Norm und steigert sich wieder am Ende des Versuchs.

Von den einzelnen Momenten des Stickstoffstoffwechsels leidet der *Kreatininstoffwechsel* bei einer derartigen Versuchsanordnung am meisten. Beim Übergang zur Reisfütterung fängt das Harnkreatinin allmählich zu steigen an, und gegen Ende der zweiten Woche ergibt der Kreatininstickstoff 0,059 bis 0,055 g anstatt der 0,04 bis 0,045 g bei dem Kontrolltier. Später sinkt der Kreatiningehalt und bleibt nicht an der Norm stehen, sondern verringert sich noch mehr. Manchmal fehlt der initiale Anstieg des Kreatinins fast gänzlich. In den beiden letzten Lebenswochen des Tieres ist die absolute Kreatininausscheidung immer unter der Norm (0,037 bis 0,031 g N).

Die Pathologie des Kreatininstoffwechsels äußert sich auch im *Auftreten des Kreatins im Harn*, was man bei normalem Futter bei erwachsenen Kaninchen niemals beobachtet hat. Gewöhnlich bemerkten wir das Kreatin am Ende der ersten Woche; sehr selten geschah es am ersten oder zweiten Tage des Versuchs. Ist das Kreatin einmal erschienen, so verschwindet es nicht wieder, sondern steigt beständig, so daß es zur Todeszeit des Tieres höhere Werte erreicht als das Kreatinin. Wenn man den Stickstoff des Kreatins und des Kreatinins in Prozenten des Gesamtstickstoffs ausdrückt, so erhält man Werte, welche angeben, daß ein immer größerer Teil des Gesamtstickstoffs in Form von Kreatin und Kreatinin ausgeschieden wird.

Normalerweise werden 2,5 bis 4 Proz. des Gesamtstickstoffs als Kreatin und Kreatinin ausgeschieden und am Ende des Versuchs steigen diese Werte bis 7 und 9 Proz.

Die Störung des Kreatininstoffwechsels zeigt sich noch deutlicher, wenn man den Kreatininkoeffizienten berechnet, welcher in der Kontrollperiode 10 bis 13 mg beträgt und am Ende des Versuchs 26 bis 27 mg erreicht.

Tabelle III.

Stickstoffstoffwechsel.

Datum 1922	Gewicht des Kaninchens g	Gehalt der Harnmenge von 2 Tagen an: Gesamt-N pro kg Körpergewicht mg	Kreatinin-N g	Kreatin-N g	(Kreatinin + Kreatin)-N des Gesamt-N Proz.	Harnsäure-N pro kg Körpergewicht mg	Harnsäure-N des Gesamt-N Proz.	Kreatininkoeffizient	Futter
25. VIII.	2000	278,0	0,044	—	4	4,8	1,74	11	Hafer und Rüben
27. VIII.	1990	257,7	0,040	—	3,89	4,5	1,76	10	
29. VIII.	2000	276,5	0,047	—	4,24	4,5	1,64	11,7	
1. IX.	2000	276,5	0,044	—	4	4,5	1,64	11	
3. IX.	2100	209,5	0,057	—	6,47	4,5	2,19	13,5	Reis
5. IX.	2100	225,2	0,057	—	6,01	5,1	2,28	13,5	
7. IX.	2090	245,4	0,044	—	4,19	7,7	3,14	10,5	
9. IX.	2100	244,2	0,059	—	5,75	8,0	3,66	14,0	
11. IX.	2080	227,4	0,049	—	5,09	6,4	2,93	11,5	
Durchschnittlich pro 24 Stunden		230,0	0,0265	—	5,10	6,6	3,04	12,6	
13. IX.	2070	247,8	0,059	0,008	6,53	5,2	2,10	16,1	Reis
15. IX.	2050	225,7	0,048	0,032	8,45	4,7	2,04	19,5	
17. IX.	2000	256,3	0,048	0,021	6,72	5,1	2,16	17,2	
19. IX.	1900	270,0	0,053	0,040	9,06	4,2	1,46	24,4	
21. IX.	2000	276,5	0,044	0,032	6,87	4,5	1,64	19,0	
Durchschnittlich pro 24 Stunden		254,0	0,0252	0,0133	7,53	4,7	1,88	19,2	
23. IX.	1980	336,1	0,041	0,055	7,20	4,3	1,28	24,2	Reis
25. IX.	1920	385,6	0,053	0,015	4,73	5,0	1,30	17,6	
27. IX.	1940	343,5	0,044	0,017	4,57	5,5	1,62	15,6	
29. IX.	1960	282,1	0,034	0,022	5,06	5,2	1,85	14,2	
1. X.	1870	252,9	0,044	0,017	6,44	5,1	2,04	16,2	
Durchschnittlich pro 24 Stunden		319	0,0216	0,0126	5,59	5,0	1,61	17,5	
3. X.	1730	356,6	0,048	0,032	6	6,3	1,62	23,1	Reis
5. X.	1630	408,8	0,034	0,063	7,27	7,3	1,78	27,2	
7. X.	1510	366,2	0,031	0,038	6,23	7,1	1,95	22,8	
Durchschnittlich pro 24 Stunden		376	0,0188	0,022	6,5	6,9	1,78	24,3	

Eine anhaltende *Fütterung der Kaninchen mit Reis bewirkte also eine Störung des Stickstoffstoffwechsels, was in einer erhöhten Harnsäureausscheidung, einem größeren Kreatininkoeffizienten und in Kreatinurie zum Ausdruck kommt.*

In Anbetracht dessen, daß bei kreatinlosem Futter das Kreatin und Kreatinin des Harns aus dem Kreatin der Gewebe bzw. der Muskeln stammt, hatte die Bestimmung des Muskelkreatins bei unserer Versuchsanordnung eine große Bedeutung. Diese Bestimmungen erwiesen, daß die Fütterung der Kaninchen mit poliertem Reis zu einer *Erhöhung*

Tabelle IV.
Stickstoffstoffwechsel.

Datum	Gewicht des Kaninchens	Gehalt der Harnmenge von 2 Tagen an: Gesamt-N pro kg Körpergewicht	Kreatinin-N	Kreatin-N	(Kreatinin + Kreatin)-N des Gesamt-N	Harnsäure-N des Gesamt-N	Harnsäure-N pro kg Körpergewicht	Kreatininkoeffizient	Futter
1922	g	mg	g	g	Proz.	Proz.	mg		
1. XI.	1700	470,5	0,044	—	2,98	1,22	5,3	12,9	
3. XI.	1710	487,1	0,040	—	2,48	1,15	5,6	11,7	Hafer und Rüben
5. XI.	1700	490,0	0,040	—	2,48	1,15	5,6	11,8	
7. XI.	1700	470,5	0,044	—	2,98	1,22	5,3	12,9	
Durchschnittlich pro 24 Stunden		479	0,021	—	2,73	1,18	5,4	12,3	
9. XI.	1700	356,4	0,049	—	4,04	1,59	5,6	14,3	
11. XI.	1710	435,3	0,049	—	3,30	1,82	7,8	14,5	
13. XI.	1700	435,3	0,055	—	3,72	2,90	12,6	16,3	Reis
15. XI.	1700	435,3	0,055	—	3,72	2,54	11,0	16,3	
17. XI.	1680	403,2	0,049	0,009	4,35	3,22	12,7	17,2	
Durchschnittlich pro 24 Stunden		412	0,0257	—	3,62	2,41	11,8	15,7	
19. XI.	1690	327,2	0,044	0,015	5,33	1,95	6,3	17,4	
21. XI.	1680	247,8	0,055	0,008	7,56	3,23	8,1	18,4	
23. XI.	1700	278,2	0,049	0,009	6,11	2,28	6,3	17,0	Reis
25. XI.	1680	220,2	0,037	0,013	6,75	2,60	5,7	14,9	
27. XI.	1550	268,3	0,049	0,010	7,09	2,46	6,6	19,0	
Durchschnittlich pro 24 Stunden		268	0,0214	0,0055	6,56	2,48	6,6	17,3	
29. XI.	1550	390,9	0,040	0,011	3,40	1,78	6,9	13,6	
1. XII.	1570	424,5	0,044	0,012	4,20	1,78	8,2	17,8	
3. XII.	1550	305,1	0,040	0,020	6,34	2,28	6,9	19,3	Reis
5. XII.	1490	263,0	0,037	0,021	7,39	2,75	7,2	19,4	
7. XII.	1450	326,2	0,040	0,010	5,28	2,51	8,2	17,2	
Durchschnittlich pro 24 Stunden		341	0,0201	0,0047	5,32	2,22	7,4	17,4	
9. XII.	1400	395,0	0,037	0,011	4,34	1,95	7,7	17,1	
11. XII.	1400	476,0	0,037	0,010	3,52	1,62	7,7	16,7	
13. XII.	1350	617,0	0,039	0,010	3,00	1,65	10,0	18,1	Reis
15. XII.	1320	363,0	0,037	0,032	7,29	2,51	9,0	26,1	
17. XII.	1300	284,6	0,031	0,040	9,23	3,64	10,3	27,3	
Durchschnittlich in 24 Stunden		427	0,0181	0,0103	5,47	2,27	8,9	21,0	

des Kreatingehalts der Muskeln führt. So hatten wir am Ende des Versuchs 0,6 bis 0,63 Proz. Kreatin in den Muskeln anstatt der normalen 0,52 bis 0,527 Proz. (s. Tabelle V).

Mineralstoffwechsel.

Wir bestimmten *Ca* und *Phosphor* im Harn, um den Einfluß der Fütterung mit Reis auf den Mineralstoffwechsel festzustellen.

Tabelle V.
Kreatingehalt in Muskeln.

Nummer der Tiere	Gewicht vor der Krankheit g	Gewicht am Tage der Bestimmung g	An welchem Avitaminosetage wurde die Bestimmung ausgeführt?	Kreatingehalt in den Muskeln Proz.
1	2015	1408	67	0,58
2	2008	1309	64	0,61
3	1710	1300	43	0,602
4	1640	930	43	0,63
5	2000	1510	36	0,603
6	2000	1330	40	0,63
7	1005	793	20	0,552
8	1970	1095	53	0,61
9	1583	975	38	0,63
10	2380	1384	60	0,603
11	1883	1007	53	0,58
12	2570	1409	69	0,61
13	1930	1099	46	0,59
14	2035	1109	57	0,63

Ca wurde nach der Methode von *Halwerson* und *Bergheim*, Phosphor mit Hilfe des essigsauren Uranyls bestimmt.

Unsere Bestimmungen zeigten, daß die Fütterung der Kaninchen mit Reis auf den Mineralstoffwechsel eine minder starke Wirkung ausübt als auf den Kohlenhydrat- und Stickstoffstoffwechsel.

Aus Tabellen VI und VII sieht man, daß ein Kaninchen bei normaler Nahrung in 24 Stunden durchschnittlich 16 bis 17 mg *Ca* auf jedes Kilogramm seines Körpergewichts ausscheidet, wogegen während des Versuchs 14 bis 16 bis 18 mg ausgeschieden wurden; folglich schwankte die *Ca*-Ausscheidung in normalen Grenzen.

Was den Phosphor anbetrifft, so betrugen die Werte während der Kontrollperiode 36 bis 49 mg. Am Anfang des Versuchs stiegen diese Werte beinahe auf das Doppelte und ergaben im Durchschnitt 69 bis 86 mg; dann hatten wir eine Zeitlang fast normalen Phosphorgehalt des Harns (35 bis 49 mg), und endlich wurden die Werte am Ende des Versuchs niedriger als die Kontrollwerte (23 bis 39 mg auf jedes Kilogramm des Körpergewichts). So wird die Ausscheidung von *Ca* im Harn der Kaninchen durch die Fütterung mit Reis fast gar nicht beeinflußt. Die Menge des Phosphors im Harn steigt bedeutend am Anfang des Versuchs; dann sinkt sie fast bis zur Norm und steht am Ende des Versuchs sogar unter der Norm.

Lipoidstoffwechsel.

Nachdem wir die Störungen des Kohlenhydrat-, Stickstoff- und Mineralstoffwechsels untersucht hatten, wollten wir den Lipoidstoff-

Tabelle VI.
Mineralstoffwechsel.

Datum 1922	Gewicht des Kaninchens g	Gehalt der Harnmenge v. 2 Tag. an Ca pro kg Körpergewicht mg	Gehalt der Harnmenge v. 2 Tag. an P_2O_5 pro kg Körpergewicht mg	Futter
25. VIII.	2000	16	32,5	Hafer und Rüben
27. VIII.	1990	16	40,2	
29. VIII.	2000	16	40,2	
1. IX.	2000	16	32,5	
Durchschnittlich in 24 Stunden		16	36,3	
3. IX.	2100	14,7	61,9	Reis
5. IX.	2100	15,2	66,6	
7. IX.	2090	15,3	83,9	
9. IX.	2100	15,7	71,4	
11. IX.	2080	14,9	62,0	
Durchschnittlich in 24 Stunden		15,1	69,1	
13. IX.	2070	14,9	36,2	Reis
15. IX.	2050	14,1	34,1	
17. IX.	2000	14,5	32,5	
19. IX.	1900	15,2	39,4	
21. IX.	2000	14,0	35,0	
Durchschnittlich in 24 Stunden		14,5	35,4	
23. IX.	1980	13,6	32,8	Reis
25. IX.	1920	14,5	36,4	
27. IX.	1940	14,4	41,2	
29. IX.	1960	13,7	35,7	
1. X.	1870	14,4	26,7	
Durchschnittlich in 24 Stunden		14,1	34,5	
3. X.	1730	15,6	23,1	Reis
5. X.	1630	15,9	21,4	
7. X.	1510	17,2	26,4	
Durchschnittlich in 24 Stunden		16,2	23,6	

Tabelle VII.
Mineralstoffwechsel.

Datum 1922	Gewicht des Kaninchens g	Gehalt der Harnmenge v. 2 Tag. an Ca pro kg Körpergewicht mg	Gehalt der Harnmenge v. 2 Tag. an P_2O_5 pro kg Körpergewicht mg	Futter
25. VIII.	2000	14,6	40	Hafer und Rüben
27. VIII.	2051	14	39	
29. VIII.	2007	14,5	42	
1. IX.	2003	15,5	41	
Durchschnittlich in 24 Stunden		14,6	40	
3. IX.	2080	14	72	Reis
5. IX.	2080	15	82	
7. IX.	1950	16	100	
9. IX.	1900	16	89	
11. IX.	1820	17	82	
Durchschnittlich in 24 Stunden		15,6	85	
13. IX.	1820	17	46	Reis
15. IX.	1820	15	38	
17. IX.	1850	15	37	
19. IX.	1830	15	43	
21. IX.	1750	16	42	
Durchschnittlich in 24 Stunden		15,6	41	
23. IX.	1700	17	41	Reis
25. IX.	1070	16	47	
27. IX.	1600	16	43	
29. IX.	1570	17	50	
1. X.	1450	19	48	
Durchschnittlich in 24 Stunden		17,0	45	
3. X.	1350	20	42	Reis
5. X.	1370	18	36	
7. X.	1390	18	35	
9. X.	1350	20	44	
11. X.	1330	19	48	
Durchschnittlich in 24 Stunden		19,0	41	

wechsel beim gleichen Futter prüfen. Zu diesem Zwecke bestimmten wir während unseres Versuchs die Lipoide des Blutes.

Die Lipoide wurden während der ganzen Versuchsdauer alle 2 Tage nach der Mikromethode von *Bang* bestimmt. Unsere Bestimmungen zeigten (s. Tabellen VIII und IX), daß die neutralen Fette und Cholesterin (*Petrolätherfraktion* von *Bang*) bei solcher Versuchsanordnung *stark herabgesetzt* werden. So hatten wir im Blute 0,036 bis 0,40 Proz.

Tabelle VIII.
Lipoidstoffwechsel.

Datum 1923	Gewicht des Kaninchens g	Petrolätherfraktion Proz.	Alkoholfraktion Proz.	Futter
10. V.	950	0,063	0,305	Hafer und Rüben
13. V.	1023	0,060	0,298	
16. V.	1005	0,062	0,309	
19. V.	957	0,053	0,234	Reis
22. V.	903	0,057	0,310	
25. V.	870	0,048	0,315	
28. V.	844	0,040	0,299	
1. VI.	828	0,036	0,309	
4. VI.	806	0,038	0,320	
7. VI.	793	0,042	0,340	

Tabelle IX.
Lipoidstoffwechsel.

Datum 1923	Gewicht des Kaninchens g	Petrolätherfraktion Proz.	Alkoholfraktion Proz.	Futter
27. VI.	3507	0,077	0,245	Hafer und Rüben
30. VI.	3656	0,078	0,235	
3. VII.	3620	0,080	0,237	
6. VII.	3009	0,068	0,235	Reis
9. VII.	2947	0,039	0,249	
12. VII.	2903	0,033	0,268	
15. VII.	2870	0,032	0,293	
18. VII.	2824	0,037	0,291	
21. VII.	2808	0,032	0,284	
24. VII.	2707	0,033	0,307	
27. VII.	2685	0,039	0,318	
30. VII.	2644	0,041	0,303	
3. VIII.	2502	0,035	0,321	
6. VIII.	2451	0,038	0,326	
9. VIII.	2409	0,043	0,329	
12. VIII.	2406	0,039	0,340	
15. VIII.	2143	0,037	0,333	
18. VIII.	2107	0,038	0,337	
21. VIII.	1900	0,043	0,340	
24. VIII.	1850	0,066	0,339	

Neutralfett und Cholesterin anstatt der 0,060 bis 0,078 Proz., welche das Blut in der Kontrollperiode enthielt. Die *Alkoholfraktion* von *Bang* (Cholesterinäther, Phosphatide und Fettsäuren) erfuhr dagegen eine *Steigerung*, als die Kaninchen mit Reis gefüttert wurden. Während der Kontrollperiode schwankte die Alkoholfraktion zwischen 0,237 bis 0,309 Proz., und während des Versuchs stieg sie bis zu 0,320 bis 0,340 Proz.

Es führt also die Fütterung der Kaninchen mit (weißem) Reis zu einer Herabsetzung der Petrolätherfraktion (nach *Bang* neutrales Fett und Cholesterin) und *zur Steigerung der Alkoholfraktion* (Cholesterinäther, Phosphatide und Fettsäuren).

2. Versuchsreihe.

Da Reis kein gewöhnliches Kaninchenfutter ist, so wird er von den Tieren nicht immer gern genommen; bald verspeisen sie mehr, bald weniger davon und die Nahrungszufuhr ist folglich bei diesem Futter keine regelmäßige, d. h. es kann während des Versuchs ein geringer quantitativer Hunger bestehen. Außerdem ist Reis für diese Tiere vielleicht kein völlig wertvolles Futter, nicht nur wegen seiner Vitaminlosigkeit, sondern auch infolge seines geringen Salz- und Eiweißgehalts

und wegen Mangel an einigen Aminosäuren. Im letzten Falle hätten wir bei Fütterung der Kaninchen mit Reis keine reine Avitaminose, d. h. der Stoffwechsel würde nicht allein durch die Abwesenheit der Vitamine, sondern auch durch einen der oben genannten Faktoren beeinflußt sein.

Um diese Frage aufzuklären, mußten wir Versuche anstellen, in denen die Kaninchen vollkommen nahrhaftes (am besten gewohntes) Futter erhielten, aus welchem jedoch alle Vitamingruppen auf irgendwelche Weise ausgeschlossen waren. Als solches Futter diente uns gewöhnlicher Hafer, der aber 3 Stunden lang im Autoklaven bis zu 137° (bei 3 Atm. Druck) erwärmt worden war, um die Vitamine der Gruppe B zu zerstören, deren der Hafer viel enthält. In solcher Weise durchwärmter Hafer wird von den Kaninchen ebenso gern verspeist wie gewöhnlicher Hafer.

Bei dieser Versuchsanordnung wurden auch der Kohlenhydrat-, Stickstoff-, Mineral- und Lipoidstoffwechsel untersucht.

Kohlenhydratstoffwechsel.

Beim Studium der Wirkung des Vitaminhungers der Kaninchen auf die Prozesse des Kohlenhydratstoffwechsels wurden in dieser Versuchsreihe Bestimmungen des Zuckers und der Amylase des Blutes vorgenommen. Die Amylase wurde nur am Ende des Versuchs bestimmt, als man die Tiere tötete; zur Bestimmung des Zuckers nahm man alle 2 Tage Blut aus den Ohrvenen. In der zweiten Versuchsreihe bedienten wir uns derselben Methode, die auch in der ersten Versuchsreihe angewandt wurde. Die Bestimmungen zeigten, daß *Fütterung der Kaninchen mit im Autoklaven behandeltem Hafer ebenfalls zu einer Verminderung der Amylase im Blute führt*, die manchmal sogar bedeutender ist als bei der Fütterung mit Reis.

In den am stärksten ausgeprägten Fällen fanden wir $D^{38^0}_{24\,h} = 16$ anstatt der Norm $D^{38^0}_{24\,h} = 40$. Folglich wird die diastatische Kraft des Blutes durch die Abwesenheit der Vitamine der Gruppe B im Futter stark herabgesetzt.

Was aber den *Zuckergehalt* des Blutes anbetrifft, so *finden wir ein etwas anderes Bild als bei der Fütterung mit Reis* (s. Tabellen X und XI). Beim Übergang zum vitaminlosen Futter fängt der Blutzucker allmählich an abzunehmen, und hat die *Hypoglykämie* ein bestimmtes Minimum erreicht, so wird sie wiederum allmählich von einer *Hyperglykämie* ersetzt, welche bis zum Ende des Versuchs dauert. Nur 1 bis 2 Tage vor dem Tode des Tieres sinkt der Zuckergehalt des Blutes wieder etwas. So schwankt der Zuckergehalt des Blutes bei Fütterung der Kaninchen mit Hafer und Rüben zwischen 0,093 bis 0,102 Proz., und bei Fütterung mit autoklavisiertem Hafer sanken diese Werte

Tabelle X.

Datum 1923	Gewicht des Kaninchens g	Blutzucker Proz.	Futter
5. VIII.	2239	0,097	Hafer und Rüben
7. VIII.	2203	0,098	
8. VIII.	2200	0,102	
10. VIII.	2240	0,096	
12. VIII.	2230	0,091	Autoklavisierter Hafer
14. VIII.	2221	0,080	
17. VIII.	2212	0,067	
20. VIII.	2203	0,063	
23. VIII.	2115	0,067	
26. VIII.	2106	0,064	
29. VIII.	2060	0,071	
1. IX.	2051	0,079	
4. IX.	2015	0,084	
7. IX.	2007	0,088	
10. IX.	1991	0,081	
13. IX.	1982	0,096	
16. IX.	1919	0,099	
19. IX.	1910	0,103	
21. IX.	1873	0,101	
24. IX.	1864	0,114	
30. IX.	1821	0,121	
2. X.	1805	0,126	
4. X.	1796	0,139	
6. X.	1753	0,142	
9. X.	1747	0,159	
10. X.	1709	0,153	
13. X.	1711	0,176	
16. X.	1706	0,183	
19. X.	1699	0,171	
21. X.	1653	0,169	

Tabelle XI.

Datum 1923	Gewicht des Kaninchens g	Blutzucker Proz.	Futter
11. VI.	1753	0,099	Hafer und Rüben
13. VI.	1799	0,100	
14. VI.	1787	0,101	
16. VI.	1794	0,103	
19. VI.	1779	0,097	Autoklavisierter Hafer
21. VI.	1771	0,091	
24. VI.	1763	0,087	
28. VI.	1767	0,069	
1. VII.	1749	0,071	
4. VII.	1734	0,067	
7. VII.	1693	0,073	
10. VII.	1659	0,079	
14. VII.	1647	0,084	
17. VII.	1631	0,089	
21. VII.	1629	0,093	
24. VII.	1591	0,099	
27. VII.	1578	0,097	
29. VII.	1563	0,101	
2. VIII.	1547	0,109	
5. VIII.	1534	0,129	
8. VIII.	1520	0,143	
12. VIII.	1500	0,151	
16. VIII.	1479	0,159	
19. VIII.	1450	0,173	
23. VIII.	1410	0,184	
26. VIII.	1397	0,179	
28. VIII.	1351	0,174	
29. VIII.	1342	0,167	

allmählich bis zu 0,067 bis 0,070 Proz. Dann bleibt der Zuckergehalt des Blutes nicht auf diesen geringen Werten stehen, sondern steigt allmählich, zuerst bis zur Norm bis 0,099 bis 0,103 Proz., dann noch mehr, und ergibt am Ende des Versuchs eine beträchtliche Hyperglykämie, bis 0,156 bis 0,201 Proz. In den letzten 3 bis 4 Lebenstagen des Tieres sinkt der Zuckergehalt des Blutes wieder bis 0,183 bis 0,129 Proz., bleibt aber dennoch weit höher als die normalen Werte. *Also führt der Vitaminhunger der Kaninchen zu einem anormalen Zuckergehalt des Blutes, was sich anfangs in einer Hypoglykämie und dann in einer Hyperglykämie äußert.*

Stickstoffstoffwechsel.

Außer dem Gesamtstickstoff, der Harnsäure, dem Kreatin und dem Kreatinin, bestimmten wir auch den Gehalt des Harns an Harnstoff, Ammoniak und Aminosäuren.

Die Harnstoffbestimmungen wurden nach der von *van Slyke* und *Gullen* veränderten Methode von *Marschalls*[1]) ausgeführt. Die Aminosäuren wurden nach *Sörensen* und das Ammoniak nach *Hahn* und *Kootz*[2]) bestimmt.

Wie in der ersten Versuchsreihe, so bestimmten wir auch diesmal den Kreatingehalt der Muskeln.

Unsere Bestimmungen (s. Tabellen XII und XIII) ergaben, daß die durch Fütterung der Kaninchen mit autoklavisiertem Hafer bedingte Avitaminose auf den Stickstoffstoffwechsel dieselbe Wirkung ausübt, wie die Fütterung mit Reis: der Gesamtstickstoff des Harns, auf 1 kg Körpergewicht berechnet, schwankt im Anfang des Versuchs in normalen Grenzen, und am Ende desselben sind die Werte stets beträchtlich höher als die Kontrollwerte. So wurden bei Fütterung der Kaninchen mit Hafer und Rüben auf jedes Kilogramm Körpergewicht 400 bis 500 mg Stickstoff ausgeschieden, und am Ende des Versuchs hatten wir schon 600 bis 620 mg Stickstoff.

Bei der Untersuchung der Harnstoffausscheidung sahen wir, daß seine Stickstoffkurve vollkommen derjenigen des Gesamtstickstoffs entsprach. Wenn wir jedoch den Harnstoffstickstoff im Prozentsatz des allgemeinen Stickstoffs ausdrücken, so fanden wir im Laufe der Avitaminose diese Werte verringert, während die übrigen stickstoffhaltigen Bestandteile des Harns (Kreatinin, Harnsäure, Ammoniak) ebenso stark zunahmen: so wurden in der Kontrollperiode auf jedes Kilogramm des Körpergewichts in 24 Stunden durchschnittlich 353 bis 426 mg Harnstoffstickstoff ausgeschieden, was 87 bis 88 Proz. des Gesamtstickstoffs des Harns ausmacht. Während des Versuchs schwankte das Quantum des ausgeschiedenen Harnstoffs zwischen 310 bis 340 bis 428 mg, was 85 bis 82 Proz. des Gesamtstickstoffs gleicht. Nur in den 10 letzten Tagen stieg der Stickstoff des Harnstoffs bis zu ansehnlichen Werten von 500 bis 514 mg.

Die Ausscheidung der *Harnsäure* steigt allmählich während des Vitaminhungers der Kaninchen; das merkt man deutlich, wenn man den Stickstoff der Harnsäure auf jedes Kilogramm des Körpergewichts des Tieres berechnet. Dabei verläuft die Kurve der ausgeschiedenen Harnsäure ohne den jähen Anstieg zu Beginn des Versuchs, den wir bei der Fütterung der Kaninchen mit dem ungewohnten Reis sahen. Aus Tabellen XII und XIII sieht man, daß die Kaninchen während der Kontrollperiode in 24 Stunden durchschnittlich von 6 bis 7,4 mg Harnsäurestickstoff ausschieden, und daß diese Werte während des Versuchs bis zu 14 bis 15 mg, ja sogar 22 mg N stiegen.

---

[1]) Siehe *Bang*, Lehrbuch der Harnanalyse 1918.

[2]) *Hahn* und *Kootz*, diese Zeitschr. **105**, 220, 1920.

Tabelle XII.

Stickstoffstoffwechsel.

Datum	Gewicht des Kaninchens	Gehalt der Harnmenge von 2 Tagen an								Kreatininkoeffizient	Futter
		Gesamt-N pro kg Körpergewicht	Kreatinin-N	Kreatin-N	(Kreatinin + Kreatin)-N des Gesamt-N	Harnsäure-N des Gesamt-N	Harnsäure-N pro kg Körpergewicht	Urea-N des Gesamt-N	Urea-N pro kg Körpergewicht		
1923	g	mg	g	g	Proz.	Proz.	mg	Proz.	mg		
1. I.	1950	394,3	0,049	—	3,18	1,47	5,8	87,9	343	12,5	Hafer und Rüben
3. I.	2000	416,5	0,051	—	3,06	1,44	6,0	88,2	367	12,7	
5. I.	2000	416,5	0,052	—	3,07	1,42	6,2	88,3	363	12,9	
7. I.	2000	384,5	0,050	—	3,16	1,49	5,4	88,1	341	12,2	
Durchschnittlich in 24 Stunden		402,9	0,025	—	3,16	1,45	5,8	88,0	353	12,5	
9. I.	2020	450,0	0,055	—	4,00	1,72	7,7	87,6	394	13,6	Autoklavisierter Hafer
11. I.	2050	375,2	0,051	—	4,27	2,02	7,6	86,8	325	12,4	
13. I.	2050	375,2	0,055	—	4,50	1,95	7,3	86,2	301	13,4	
15. I.	1980	360,6	0,057	—	4,64	2,46	8,9	85,9	309	14,3	
17. I.	1950	341,8	0,054	—	4,13	2,64	9,0	85,1	290	15,6	
Durchschnittlich in 24 Stunden		380,5	0,027	—	4,23	2,15	8,1	86,3	326	14,2	
19. I.	1900	373,6	0,055	0,002	4,96	2,61	9,8	85,3	320	15,0	Autoklavisierter Hafer
21. I.	1900	373,6	0,051	0,010	5,32	2,62	9,7	85,3	321	16,0	
23. I.	1860	358,3	0,047	0,013	5,28	3,01	10,9	84,4	302	15,5	
25. I.	1820	343,3	0,047	0,011	5,11	3,00	10,2	83,9	287	15,9	
27. I.	1800	396,6	0,044	0,015	5,07	2,81	11,1	84,2	321	16,3	
Durchschnittlich in 24 Stunden		369,0	0,024	0,005	4,3	2,80	10,3	84,6	310	15,5	
29. I.	1740	360,8	0,041	0,021	5,78	3,00	11,1	83,1	298	17,7	Autoklavisierter Hafer
1. II.	1700	391,7	0,039	0,032	6,08	3,01	10,7	83,3	326	20,8	
3. II.	1660	376,5	0,041	0,025	6,67	3,21	11,8	82,9	312	19,8	
5. II.	1600	446,2	0,039	0,035	6,72	2,61	12,1	83,5	422	23,1	
7. II.	1650	463,0	0,044	0,034	6,30	2,29	11,6	88,7	386	23,6	
Durchschnittlich in 24 Stunden		407,6	0,020	0,014	5,14	2,82	11,4	82,0	348	21,2	
9. II.	1650	463,0	0,041	0.048	6,09	2,43	10,6	83,1	387	26,9	Autoklavisierter Hafer
11. II.	1620	385,8	0,043	0,034	6,81	3,50	10,1	82,6	319	24,7	
13. II.	1540	432,4	0,042	0,048	5,32	3,29	13,5	82,8	358	28,9	
15. II.	1510	413,8	0,037	0,047	6,65	2,81	14,2	82,7	342	27,8	
17. II.	1500	476,0	0,036	0,053	5,09	3,07	11,6	83,0	398	30,0	
Durchschnittlich in 24 Stunden		434,2	0,020	0,023	6,31	3,02	12,0	82,8	360	27,6	

Die Abwesenheit der Vitamine der Gruppe B im Futter der Tiere beeinflußt die Ausscheidung des *Ammoniaks* im Harn ebenso wie auch die Ausscheidung der Harnsäure, d. h. der Ammoniakgehalt des Harns wird während des Versuchs allmählich immer größer, was man deutlich wahrnehmen kann, wenn man den Ammoniakstickstoff im Prozentsatz

Tabelle XIII.

Stickstoffstoffwechsel.

Datum 1922	Gewicht des Kaninchens g	Gehalt der Harnmenge von 2 Tagen an: Gesamt-N pro kg Körpergewicht mg	Kreatinin-N g	Kreatin-N g	(Kreatinin + Kreatin)-N des Gesamt-N Proz.	Harnsäure-N des Gesamt-N Proz.	Harnsäure-N pro kg Körpergewicht mg	Urea-N des Gesamt-N Proz.	Urea-N pro kg Körpergewicht mg	Kreatininkoeffizient	Futter
2. VII.	1880	505,2	0,044	—	2,80	1,6	7,0	88,3	445	12,2	Hafer und Rüben
4. VII.	1850	990,2	0,047	—	2,82	1,4	6,4	88,5	398	12,7	
6. VII.	1820	503,9	0,045	—	2,81	1,3	7,1	87,9	426	12,3	
8. VII.	1850	450,3	0,046	—	2,83	1,5	6,8	—	—	12,6	
Durchschnittlich in 24 Stunden		477,7	0,022	—	2,81	1,5	6,8	88,2	423	12,4	
10. VII.	1650	550,8	0,051	—	2,85	1,5	11,3	88,2	446	15,4	Autoklavisierter Hafer
12. VII.	1650	466,9	0,055	—	3,57	2,3	10,6	86,8	404	16,6	
14. VII.	1620	474,0	0,067	—	4,35	2,1	11,1	85,6	408	26,7	
16. VII.	1600	480,6	0,064	—	4,35	2,3	11,0	86,3	410	20,9	
18. VII.	1600	520,6	0,057	—	3,30	1,9	10,2	85,9	455	17,1	
Durchschnittlich in 24 Stunden		497,2	0,029	—	3,68	2,0	10,6	86,5	423	19,3	
20. VII.	1600	568,1	0,051	0,010	3,35	1,9	11,0	84,7	487	19,0	Autoklavisierter Hafer
22. VII.	1580	527,3	0,051	0,018	4,14	1,9	10,3	84,1	446	21,8	
24. VII.	1560	539,9	0,047	0,009	3,36	2,1	11,2	84,5	448	17,9	
26. VII.	1500	416,6	0,044	0,007	3,31	2,0	10,4	83,9	438	17,0	
28. VII.	1490	479,1	0,041	0,015	3,92	2,4	13,2	84,2	362	19,2	
Durchschnittlich in 24 Stunden		506,2	0,023	0,0059	3,61	2,0	11,2	84,2	436	16,9	
30. VII.	1500	606,0	0,044	0,025	3,79	1,9	13,3	83,7	510	23,0	Autoklavisierter Hafer
2. VIII.	1330	626,3	0,041	0,016	3,42	2,2	14,0	83,8	524	21,4	
4. VIII.	1320	683,6	0,039	0,032	3,21	2,2	15,2	83,4	578	26,8	
6. VIII.	1300	589,2	0,037	0,027	4,16	2,7	16,4	83,3	493	24,6	
8. VIII.	1250	666,4	0,037	0,034	4,26	2,6	17,5	83,3	554	28,4	
Durchschnittlich in 24 Stunden		634,3	0,019	0,013	3,90	2,3	15,0	83,5	531	24,8	

des allgemeinen Stickstoffs berechnet. Wenn der Stickstoff des Ammoniaks normalerweise 0,22 bis 0,51 Proz. des ganzen Stickstoffs ausmacht, so wird während der Avitaminose 0,8 bis 0,9 Proz. und sogar 1,2 Proz. des Gesamtstickstoffs als Ammoniak ausgeschieden. Was die *Aminosäuren* anbetrifft, so enthält Kaninchenharn normalerweise nur Spuren davon (in 48 Stunden 2 bis 5 mg des Stickstoffs der Aminosäuren). Während der ganzen Versuchszeit blieben diese Werte fast ohne Veränderung.

Bei Fütterung der Kaninchen mit durchwärmtem Hafer blieben die Störungen des Kreatininstoffwechsels ganz denjenigen gleich,

Tabelle XIV.

Kreatingehalt in Muskeln.

Nummer der Tiere	Gewicht (in g) vor der Krankheit	Gewicht (in g) am Tage der Bestimmung	An welchem Avitaminosetag wurde die Bestimmung ausgeführt?	Kreatingehalt in den Muskeln Proz.	Futter
1	3622	1853	40	0,603	Durchwärmter Hafer
2	2281	1653	74	0,592	
3	1794	1321	58	0,559	
4	2000	1300	57	0,602	
5	1550	1400	19	0,552	
6	1850	1050	33	0,638	
7	2209	1425	47	0,558	
8	2078	1632	29	0,550	
9	2975	2250	27	0,603	
10	1580	1093	36	0,580	
11	1834	1230	43	0,570	
12	1624	993	39	0,559	
13	2062	1303	44	0,552	

welche bei Fütterung mit Reis entstanden waren. Die Menge des Kreatinins sank im Harn ebenfalls, und nur am Anfang des Versuchs, vor Eintritt der Kreatinurie, sahen wir erhöhte Werte. Kreatin erschien im Harn etwas später, als es in der ersten Versuchsreihe der Fall war, aber ist Kreatin einmal erschienen, so verschwindet es nicht wieder, sondern nimmt immer mehr zu und erreicht zur Zeit des Todes beträchtliche Werte, welche sogar die normalerweise ausgeschiedene Kreatininmenge übertrafen. Im Laufe der Avitaminose steigt allmählich die Summe des Kreatins und Kreatinins auf Kosten des Kreatins. Berechnen wir den Stickstoff des Kreatins und Kreatinins in Prozenten des allgemeinen Stickstoffs, so finden wir eine Steigerung, die jedoch nicht so stark ist wie bei Fütterung der Kaninchen mit Reis. Der Kreatininkoeffizient wächst während der Avitaminose: so fand man in der Kontrollperiode 0,049 bis 0,05 mg Kreatininstickstoff im Harn der Kaninchen in 48 Stunden. Am Anfang des Versuchs betrugen diese Werte 0,055 bis 0,057 g, dann sanken sie, und am Ende des Versuchs wurden 0,055 bis 0,053 g ausgeschieden.

Dabei steigt der Kreatininkoeffizient bis 30 bis 35 mg anstatt 13 bis 16 mg bei der Kontrolle.

Eine solche erhöhte Ausscheidung des Kreatins + Kreatinin erscheint als Folge des erhöhten Kreatingehalts der Muskeln. Tabelle XIV zeigt, daß am Ende des Versuchs der Gehalt der Muskeln an Kreatin 0,56 bis 0,60 Proz. betrug.

So führt also die Avitaminose zu einer starken Störung des Stickstoffstoffwechsels, welche in einer relativen Erhöhung der Gesamtstickstoffausscheidung und in einer erhöhten Ausscheidung von Harn-

säure und Ammoniak im Harn zum Ausdruck kommt. Dabei bleiben die Aminosäurewerte des Harns unverändert. Die Pathologie des Kreatininstoffwechsels äußert sich in erhöhtem Kreatingehalt der Muskeln, und dieses führt zu einer Steigerung des Kreatininkoeffizienten sowie zur Kreatinurie.

Mineralstoffwechsel.

Um eine Einsicht in den Einfluß des vitaminlosen Futters auf die Prozesse des Mineralstoffwechsels zu gewinnen, bestimmten wir in dieser Versuchsreihe außer Phosphor und Calcium auch noch das Chlor im Harn.

Die Bestimmung des Chlors wurde nach der Methode von *Volhard* ausgeführt.

Tabelle XV.

Mineralstoffwechsel.

Datum 1923	Gewicht des Kaninchens g	Gehalt der Harnmenge von 2 Tagen an			Futter
		Ca pro kg Körpergewicht mg	P_2O_5 pro kg Körpergewicht mg	NaCl pro kg Körpergewicht mg	
2. I.	1500	21	66	133	Hafer und Rüben
4. I.	1503	20	58	118	
6. I.	1507	22	60	126	
8. I.	1504	21	63	133	
10. I.	1500	20	60	133	Durchwärmter Hafer
12. I.	1507	21	54	125	
14. I.	1504	21	56	126	
16. I.	1500	20	56	133	
18. I.	1460	21	61	130	
20. I.	1420	21	59	130	
22. I.	1400	22	67	135	
24. I.	1380	23	61	136	
26. I.	1350	23	74	137	
28. I.	1370	22	73	131	
30. I.	1360	23	62	132	
1. II.	1370	21	72	135	
3. II.	1360	23	66	132	
5. II.	1360	22	66	132	
7. II.	1320	22	64	131	
9. II.	1321	21	66	137	
11. II.	1310	22	64	134	
13. II.	1300	22	65	140	
15. II.	1260	23	62	139	
17. II.	1261	22	67	140	
19. II.	1180	23	71	148	
21. II.	1170	23	70	159	
23. II.	1100	25	72	168	
25. II.	1070	26	70	165	
27. II.	1030	26	77	148	
1. III.	1010	27	69	147	
3. III.	993	25	70	168	

Tabelle XVI.

Mineralstoffwechsel.

Datum 1923	Gewicht des Kaninchens g	Gehalt der Harnmenge von 2 Tagen an			Futter
		Ca pro kg Körpergewicht mg	P_2O_5 pro kg Körpergewicht mg	NaCl pro kg Körpergewicht mg	
2. VII.	1800	17	50	111	Hafer und Rüben
4. VII.	1850	16	48	102	
6. VII.	1820	18	47	105	
8. VII.	1850	17	51	108	
10. VII.	1650	18	54	90	Durchwärmter Hafer
12. VII.	1650	18	51	115	
14. VII.	1620	17	52	123	
16. VII.	1600	18	50	118	
18. VII.	1600	19	50	121	
20. VII.	1600	18	43	118	
22. VII.	1580	18	44	123	
24. VII.	1560	16	47	121	
26. VII.	1500	17	50	123	
28. VII.	1490	18	51	120	
30. VII.	1800	21	43	113	
2. VIII.	1330	20	60	124	
4. VIII.	1320	21	53	132	
6. VIII.	1300	22	46	130	
8. VIII.	1250	20	52	144	
10. VIII.	1230	21	44	130	
12. VIII.	1150	23	43	131	
14. VIII.	1050	24	59	142	

Unsere Bestimmungen (s. Tabellen XV und XVI) zeigten, daß bei dieser Versuchsanordnung der Mineralstoffwechsel fast ungestört bleibt. So schwankte die relative Ausscheidung von Chlor und Phosphor während des Versuchs in normalen Grenzen, und nur die Menge des Calciums stieg etwas am Ende des Versuchs: anstatt der normalen 16 bis 20 mg hatten wir 25 bis 27 mg Calcium im Harn in 24 Stunden. *So wird die Ausscheidung von Phosphor und Chlor durch die Abwesenheit der Vitamine der Gruppe B fast gar nicht beeinflußt.*

Lipoidstoffwechsel.

Bei Fütterung der Kaninchen mit erhitztem Hafer verhält sich der Lipoidstoffwechsel etwas anders als bei Fütterung mit Reis: bei diesem Futter beobachtet man nicht nur eine Steigerung von *Bangs* Alkoholfraktion (Cholesterinester, Phosphatide und Fettsäuren), sondern auch eine Erhöhung der Petrolätherfraktion (neutrales Fett und Cholesterin). So zeigt die Petrolätherfraktion in der Kontrollperiode 0,065 bis 0,070 Proz., und während des Versuchs stieg sie bis 0,079 bis 0,084 Proz. Die Alkoholfraktion zeigte normalerweise 0,259 bis 0,263 Proz., und bei Fütterung der Kaninchen mit durchwärmtem Hafer stieg sie bis zu 0,291 bis 0,299 Proz. (s. Tabellen XVII und XVIII).

Tabelle XVII.
Lipoidstoffwechsel.

Datum 1923	Gewicht des Kaninchens g	Petrolätherfraktion Proz.	Alkoholfraktion Proz.	Futter
5. IV.	2953	0,065	0,261	Hafer und Rüben
7. IV.	2957	0,068	0,259	
9. IV.	2975	0,064	0,263	
12. IV.	2908	0,058	0,270	Durchwärmter Hafer
15. IV.	2844	0,062	0,274	
18. IV.	2816	0,072	0,273	
21. IV.	2773	0,076	0,271	
24. IV.	2705	0,074	0,279	
27. IV.	2694	0,079	0,281	
30. IV.	2577	0,077	0,292	
1. V.	2508	0,079	0,294	
4. V.	2428	0,075	0,296	
7. V.	2380	0,078	0,281	
10. V.	2364	0,076	0,286	
13. V.	2307	0,082	0,291	
16. V.	2250	0,084	0,279	

Tabelle XVIII.
Lipoidstoffwechsel.

Datum 1923	Gewicht des Kaninchens g	Petrolätherfraktion Proz.	Alkoholfraktion Proz.	Futter
10. III.	2243	0,067	0,261	Hafer und Rüben
13. III.	2207	0,069	0,265	
15. III.	2209	0,070	0,263	
18. III.	2253	0,068	0,252	Durchwärmter Hafer
21. III.	2048	0,085	0,257	
24. III.	1957	0,083	0,268	
27. III.	1894	0,078	0,265	
30. III.	1857	0,082	0,269	
3. IV.	1839	0,072	0,271	
6. IV.	1774	0,070	0,279	
9. IV.	1703	0,074	0,291	
12. IV.	1678	0,073	0,289	
15. IV.	1547	0,082	0,287	
18. IV.	1508	0,083	0,283	
21. IV.	1493	0,079	0,279	
24. IV.	1474	0,084	0,277	

Folglich führt der durch Fütterung der Kaninchen mit durchwärmtem Hafer bedingte Avitaminosehunger zu einer schwachen Hyperlipämie.

Der erhöhte Lipoidgehalt des Blutes wurde auch bei anderen Formen der Avitaminose beobachtet. So fand *Lawaczek* bei experimenteller Polyneuritis der Tauben eine Erhöhung des Cholesteringehalts des

Blutes und der Organe. *Collazo* und *Alpern* fanden gesteigerten Lipoidgehalt des Blutes der Meerschweinchen bei experimentellem Skorbut und bei Polyneuritis der *Tauben*.

Ob der Unterschied im Verhalten der Petrolätherfraktion in den von uns bei Fütterung der Kaninchen mit durchwärmtem Reis erhaltenen Resultaten von einer Verminderung des Cholesterins oder des neutralen Fettes abhängig ist, das konnten wir nicht feststellen, weil es uns an Digitonin fehlte, welches zur Trennung des neutralen Fettes von Cholesterin notwendig ist.

Bei der Übersicht der Ergebnisse der ersten und zweiten Versuchsreihe gelangten wir zu folgendem Schluß: Die Anwesenheit der Vitamine der Gruppen A und C im Kaninchenfutter ist nicht unbedingt nötig, da die ausschließliche Fütterung mit Hafer — welcher die genannten Vitamingruppen nicht enthält — das Wohlbefinden der Tiere keineswegs beeinträchtigt: sie verlieren nicht an Gewicht und die Stoffwechselprozesse verlaufen bei ihnen normal. Die Anwesenheit der Vitamine der Gruppe B ist jedoch unbedingt erforderlich, denn die Fütterung mit poliertem Reis oder mit erhitztem Hafer führt zu einer Störung der Prozesse des Kohlenhydrat-, Stickstoff- und Lipoidstoffwechsels, woran die Tiere zugrunde gehen.

Zusammenfassung.

1. Die Anwesenheit der Vitamine der Gruppen A und C im Kaninchenfutter ist nicht unbedingt nötig.

2. Die Abwesenheit der Vitamine der Gruppe B im Kaninchenfutter löst eine starke Störung des Stoffwechsels aus, welche den Tod des Tieres herbeiführt.

3. Die Fütterung der Kaninchen mit Reis bedingt eine Störung der Kohlenhydratstoffwechselprozesse, was sich in einer geringen Hypoglykämie äußert, auf welche ein Hyperglykämiestadium folgt; darauf tritt abermals eine Hypoglykämie ein.

4. Die durch Fütterung mit *autoklavisiertem* Hafer hervorgerufene Avitaminose der Kaninchen bringt eine Hypoglykämie mit sich, worauf sich eine steigende Hyperglykämie einstellt, die bis zum Ende des Versuchs dauert.

5. Der Vitaminhunger der Kaninchen (Reis oder *durchwärmter* Hafer) ruft eine Abnahme der diastatischen Kraft des Blutes hervor.

6. Die Abwesenheit der Vitamine der Gruppe B im Futter der Kaninchen führt zu einer Störung des Stickstoffstoffwechsels, welche sich in erhöhter Ausscheidung von Harnstoff, Harnsäure und Ammoniak und gesteigertem Kreatingehalt der Muskeln äußert; letzteres bringt eine Erhöhung des Kreatininkoeffizienten und eine Kreatinurie mit sich.

7. Der Mineralstoffwechsel bleibt beim Vitaminhunger der Kaninchen fast ungestört.

8. Die Fütterung der Kaninchen mit Reis vermindert den Gehalt des Blutes an neutralem Fett und Cholesterin (Petrolätherfraktion von *Bang*) und erhöht die Alkoholfraktion (Cholesterinester, Phosphatide und Fettsäuren).

9. Die durch Fütterung mit autoklavisiertem Hafer bedingte Avitaminose ruft eine Hyperlipämie hervor (Erhöhung der Petroläther- und Alkoholfraktion der Lipoide).

Über fluoreszierende Oxydationsprodukte des Bilirubins und deren Bedeutung als Fehlerquelle bei dem üblichen Urobilinnachweis.

Schlußbemerkung auf die Erwiderung von *H. K. Barrenscheen* u. *O. Weltmann* in dieser Zeitschr. 149, 329, 1924.

Von

A. Adler.

(Eingegangen am 2. November 1924.)

Auf die „Erwiderung“ der Herren *Barrenscheen* und *Weltmann* habe ich folgendes zu bemerken; ich beschränke mich dabei auf die klare Feststellung des rein Tatsächlichen[1]).

Zu 1. a) Ich habe die Methode des Urobilinnachweises, auch in bilirubinhaltigen Medien Jodzusatz zu benutzen, verlassen, wie ich in meinen „Bemerkungen“ schon sagte, weil sich Schwierigkeiten in der Beurteilung ergaben, und zwar bei Anwesenheit geringer Urobilinmengen. In meiner ersten Mitteilung (Deutsch. Arch. f. klin. Med. 188) habe ich ausdrücklich gesagt (S. 319), daß bei hohen Urobilinmengen während der Ausführung der Verdünnung die Biliverdinfärbung bereits verschwunden ist, wenn Urobilinfluoreszenz noch vorhanden ist. Um aber auch geringe Urobilinmengen in bilirubinhaltigem Substrat nachweisen zu können, wurde die Probe ohne Jodzusatz angestellt und diese dann ausschließlich für den Urobilinnachweis in bilirubinhaltigen Flüssigkeiten verwandt. Weil eben auch von vornherein auf diese Möglichkeit von mir ausdrücklich hingewiesen wurde (s. S. 319, Fußnote), erschien mir eine erneute, getrennte Mitteilung überflüssig.

b) Es ist unzutreffend, daß ich die Methode des Jodzusatzes zum Urobilinnachweis, auf die ich, Klin. Wochenschr. Nr. 36, „großen Wert legte“, „alsbald verlassen habe“, sie wird vielmehr dauernd nach wie vor von mir geübt. Die Herren versuchen aber in durchaus unzulässiger Weise die eben erwähnte Arbeit mit meinen Bemerkungen mit der ihren zu verquicken, um die einen Ausführungen gegen die anderen ausspielen zu können. Bei einer auch nur einigermaßen aufmerksamen Lektüre meiner Mitteilungen in Nr. 36 der Klin. Wochenschrift hätten sie ersehen müssen, daß in der erwähnten Arbeit nicht mit einem Worte von dem Urobilinnachweis in bilirubinhaltigen Medien die Rede ist, sondern lediglich die Frage behandelt

[1]) Diese Bemerkungen wurden bereits im August d. J. schon einmal eingesandt, gelangten damals aber nicht an die Redaktion, sondern sind auf der Post verloren gegangen. *A. Adler.*

wird, ob es tunlich erscheint, das Gesamturobilin als Urobilinogen oder Urobilin nachzuweisen. Diese Verquickung nicht in Verbindung stehender Arbeiten bedingt eine Verschleierung der Tatsachen.

c) Der Satz: „Er scheint also in praxi die Konsequenzen aus unseren Untersuchungen gezogen zu haben" kann nicht anders verstanden werden, als daß meine Angaben, schon lange vor der Publikation von *Barrenscheen* und *Weltmann* den Urobilinnachweis in bilirubinhaltigem Substrat ohne Jod ausgeführt zu haben, nicht den Tatsachen entsprechen. Gegen diese Unterstellung weiß ich mich nicht anders zu verwahren, als meine Angaben unter Beweis zu stellen, daß ***notorisch*** seit Anfang des Jahres 1922 von mir in hiesiger Klinik in bilirubinhaltigen Medien Urobilin ohne Jodzusatz nachgewiesen wird.

Zu 2 und 4: Es ist unzutreffend, daß ich in den berichteten Fällen von bei Choledochusverschluß untersuchter Fistelgalle *gleichzeitige* Kontrollen mit und ohne Jodzusatz angegeben habe. Ich habe vielmehr ausdrücklich gesagt, daß jene Untersuchungen ohne Jodzusatz ausgeführt sind, und daß ich vielmehr nur ganz anfangs, als ich in bilirubinhaltigen Medien noch Jodzusatz anwandte, beide Methoden nebeneinander ausführte. Die Verknüpfung auch dieser beiden getrennt voneinander zu betrachtenden Tatsachen bedingt wiederum eine *Verschleierung* der tatsächlichen Verhältnisse.

Zu 3: Es ist ferner unrichtig, daß von mir irgendwelche auch nur scheinbare Prioritätsansprüche erhoben worden seien. Herr *Weltmann* „wird es aber nicht in Abrede stellen können", daß ich ihm auf seine Mitteilung von auftretender Fluoreszenz nach Jodzusatz in bilirubinhaltigen Medien sofort sagte, an Harnen sei dies ausgeschlossen, dies aber nicht, weil ich die Konsequenzen aus ihren Arbeiten gezogen hätte, die ich ja bis dahin noch gar nicht kannte, sondern weil mir eine ganze Anzahl von täglichen quantitativen Harnuntersuchungen auf Bilirubin und Urobilin zu Gebote standen, die hätten erkennen lassen müssen, wenn Bilirubin zu Urobilin umgewandelt worden wäre. Die Bestätigung von Herrn *Weltmann* und die dann erschienene Arbeit der Autoren zeigte die Richtigkeit meiner Angaben.

Meine Feststellungen bleiben also voll zu Recht bestehen. Die Ergebnisse der Untersuchungen von *Barrenscheen* und *Weltmann* haben keinerlei Anwendung zu finden auf meine Untersuchungsresultate.

Tierische Kalorimetrie.

V. Mitteilung:

Beitrag zur spezifisch-dynamischen Wirkung der Fette.

Von

Josef Melly und **Andreas v. Rötth.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 3. November 1924.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die Meinungen darüber, wie man sich die umsatzsteigernde Wirkung der aus der Nahrung resorbierten Stoffe vorzustellen hat, sind geteilt. Ob man sich aber der *Zuntz*schen Auffassung anschließt, wonach bestimmte der Verwertung vorangehende Vorgänge (wie Hydrolyse, Resorption usw.) einen gewissen Aufwand an umgesetzter chemischer Energie erheischen (Darmarbeit), oder aber die *Rubner*sche Auffassung teilt, wonach die resorbierten Stoffe einen spezifischen Reiz auf die Körperzellen ausüben (welch letztere Auffassung heute wohl weit mehr Anhänger als die andere hat), gibt keine dieser beiden Theorien darüber Aufschluß, wie man sich den sonderbaren Befund einiger Autoren zu erklären hat, wonach durch Fettaufnahme der Energieumsatz *herabgesetzt* werden kann. Alles in allem gehören hierher, soweit es sich um die leichter, also auch uns zugängliche Literatur handelt, die Beobachtungen von *Koraen*, eine Beobachtung von *Rubner* und zwei Versuche von *Gigon*.

Koraen[1]) hat in zwei sechsstündigen Selbstversuchen den Nüchternwert seiner CO_2-Produktion festgestellt; und zwar entfielen vier von diesen Versuchen auf den Monat Oktober, je einer auf Dezember und den darauffolgenden Januar.

Im dazwischen liegenden Monat November bestimmte *Koraen* wieder in sechs Zweistundenversuchen seine CO_2-Produktion nach Einfuhr von 65,6 g Fett (neben 2,28 g Eiweiß und 13,3 g Kohlenhydrat), enthaltend 674 kg/Cal, also etwa ein Viertel des Tagesbedarfs. Der

[1]) *Gunnar Koraen*, Skand. Arch. f. Physiol. **11**, 176, 1901.

erste dieser sechs Versuche umfaßte die erste und zweite, der zweite die zweite und dritte Stunde usw. Aus den Ergebnissen seiner Versuche folgert *Koraen*, daß durch die Einfuhr der genannten Fettmengen der Energieumsatz nicht gesteigert, sondern im Gegenteil herabgesetzt wird; fügt allerdings hinzu, daß sich aus der CO_2-Produktion nicht immer sicher auf den Gesamtumsatz schließen läßt.

An einer Stelle berichtet *Rubner*[1]) über einen Versuch, in dem der Energieumsatz durch Fetteinfuhr nicht verändert wird, über einen zweiten, in dem er erhöht, und über einen dritten, in dem er herabgesetzt wird. Im letzterwähnten Versuch hatte der Energiegehalt des eingeführten Fettes den Bedarf um 61 Proz. übertroffen, und trotzdem betrug der Umsatz

am vorangehenden Hungertage	955 kg/Cal
„ Tage der Fetteinfuhr	914 „
„ nachfolgenden Hungertage	956 „

was einer 4,4proz. Abnahme gleichkommt.

Gigon[2]) bestimmte in Selbstversuchen seinen O_2-Verbrauch (und die CO_2-Produktion) zunächst in je einem Nüchternversuch Ende November 1908 und Ende April 1910; sodann in zwei $7\frac{1}{2}$-Stundenversuchen nach einmaliger Einfuhr von je 50 g Olivenöl anfangs Juni und anfangs Juli 1910, und kam zu dem Ergebnis, daß durch die Fetteinfuhr geringer Fettmengen der Energieumsatz herabgesetzt wird.

Die aus der Literatur bekannten weit zahlreicheren Versuche, in denen nach Fetteinfuhr eine *Steigerung* des Energieumsatzes konstatiert wurde, sollen, da an dieser Tatsache nicht gezweifelt werden kann, hier unerwähnt bleiben. Es kommt uns hier nur auf die Feststellung dessen an, inwieweit die oben erwähnten Versuche, in denen eine *Abnahme* des Energieumsatzes konstatiert wurde, beweisend sind oder nicht?

Was zunächst den *Rubner*schen Befund anbelangt, ist an seiner Richtigkeit unter anderem aus dem Grunde nicht zu zweifeln, da ja in der betreffenden Mitteilung alle Daten der Stoffwechselversuche, aus denen der Energieumsatz berechnet wurde, genau angeführt sind.

Um die *Koraen*schen Versuchsergebnisse beurteilen zu können, dürfte es zweckmäßig sein, sie wie folgt zu gruppieren:

Nüchternwert in der Vorperiode: 22,28 g CO_2 pro Stunde.

Nach der Fetteinfuhr: 22,10, 21,85, 20,73, 22,28, 21,13, 21,93 und 20,03 g CO_2 in den einander folgenden Stunden.

Nüchternwert in der Nachperiode: 21,99 g CO_2 pro Stunde.

---

[1]) *Max Rubner*, Gesetze des Energieverbrauchs 1902, S. 51.

[2]) *Alfred Gigon*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **140**, 509, 1911.

Es ist ersichtlich, daß von sieben Werten der Fettperiode sechs kleiner sind als der Mittelwert, sei es der Vor-, sei es der Nachperiode, und fünf kleiner sind als der Mittelwert der Nachperiode, der ja selbst kleiner ist als der der Vorperiode. *Für* die Beweiskraft der *Koraen*schen Werte im Sinne einer Abnahme des Energieumsatzes spricht der Umstand, daß die Nüchternversuche verhältnismäßig kurz vor und nach der Fettperiode ausgeführt wurden; *gegen* ihre Beweiskraft anscheinend der Umstand, daß nur die CO_2-Produktion und nicht auch der O_2-Verbrauch bestimmt wurde. Da der kalorische Wert des produzierten CO_2 je nach dem respiratorischen Quotienten ein sehr verschiedener ist, kann aus einer Veränderung der CO_2-Werte überhaupt nichts gefolgert werden, wenn nicht auch der respiratorische Quotient bekannt ist. Da aber gerade bei Fettverbrennung der respiratorische Quotient nicht wesentlich verschieden ist vom Hungerquotienten, dürfte auch der kalorische Wert des produzierten CO_2 in *Koraens* Fettversuchen sehr ähnlich dem in seinem Hungerversuch gewesen sein, so daß ein Vergleich wohl gestattet ist.

In *Gigons* Versuchen betrug der stündliche O_2-Verbrauch:

Nüchtern		*Nach Fettaufnahme*	
November 1908	21,61 g	Juni 1910	19,65 g
April 1910	20,36 g	Juli 1910	20,03 g

Bezüglich dieser Versuche kann man, wie dies schon *Benedict* und *Carpenter*[1]) getan haben, den berechtigten Einwand erheben, daß einer der beiden Nüchternversuche, mit dessen Ergebnissen *Gigon* seine Fettversuche verglichen hat, zwei bzw. drei Monate früher, der andere Nüchternversuch gar zwei Jahre früher ausgeführt wurde. Benutzt man, was ja allein einigermaßen statthaft ist, den um nur Monate zurückliegenden Nüchternversuch als Vergleichsbasis, so läßt sich für den ersten Fettversuch eine Abnahme um 3 Proz., für den zweiten eine solche von bloß 1 Proz. errechnen.

Es geht aus diesen Ausführungen wohl die Möglichkeit, ja die Wahrscheinlichkeit einer Abnahme des Energieumsatzes nach Fettaufnahme hervor, jedoch auch, daß die oben erwähnten Versuche infolge ihrer Mängel einer Wiederholung bzw. Bestätigung dringend bedürfen. Dies war der Anlaß zu den nachstehend beschriebenen Versuchen, die im Institut noch zu einer Zeit ausgeführt wurden, als es unter der Leitung weiland *F. Tangls* gestanden hatte.

[1]) *Francis G. Benedict* and *Thorne M. Carpenter*, Food ingestion and energy transformations with special reference to the stimulating effect of nutrients. Published by the Carnegie Institution of Washington, Publication Nr. 261, 1918, S. 264.

Beschreibung unserer Versuche.

Um irgend eine Veränderung im Energieumsatz in kurzen Zeitintervallen zu verfolgen, gibt es keine Methode, die der *Zuntz-Geppert*schen überlegen wäre, daher auch unsere Versuche nach dieser Methode ausgeführt wurden, und zwar nach *Tangls*[1]) Vorgang an kuraresierten und mit der *H. H. Meyer*schen Pumpe künstlich ventilierten Hunden. Bezüglich der Kautelen, unter denen allein die an kuraresierten Tieren erhaltenen Ergebnisse verwertet werden können, sei auf unsere vorangehende Mitteilung[2]) verwiesen; hier sei bloß in aller Kürze wiederholt, daß bei der Bewertung der Versuchsergebnisse innerhalb jeder Versuchsreihe diejenigen Versuche unberücksichtigt geblieben sind, in denen ein erheblicher Abfall des Blutdruckes stattgefunden hatte, da erfahrungsgemäß durch diesen Umstand allein schon eine ganz bedeutende Abnahme des Gaswechsels stattfinden kann.

In jeder Versuchsreihe wurde am Hunde, der vorangehend 16 bis 20 Stunden lang nichts mehr zu fressen bekam, der Nüchterngaswechsel in drei bis vier Versuchen bestimmt, und erst als wir über einige hinreichend übereinstimmende Werte verfügten, haben wir dem Tiere, meistens gegen die Mittagsstunde, Fett durch eine Schlundsonde eingegossen, die ihm vor dem Beginn der Respirationsversuche eingeschoben ward. In vier Versuchsreihen kam reines Olivenöl, in anderen vier Versuchsreihen geschmolzenes Schweinefett, beides mit körperwarmem Wasser energisch geschüttelt, in Form einer groben Emulsion zur Verwendung. Bald nachdem das Fett eingebracht wurde, haben wir die Respirationsversuche fortgesetzt, und waren es meist äußere Umstände, seltener der Zustand des Versuchstieres, die den Abbruch der Versuche veranlaßt hatten.

Sowohl in den Normalversuchen, als auch nach Einführung der Fette wurde jede Bestimmung, sei es der CO_2-Produktion, sei es des O_2-Verbrauchs, als mißlungen erachtet und verworfen, wo die beiden Parallelanalysen um mehr als 0,10 Proz. voneinander verschieden waren.

Nach Abschluß je einer Versuchsreihe wurde in dem Magen- und Darminhalt des obduzierten Tieres eine Fettbestimmung durch Ausschütteln mit Äther vorgenommen. Der Unterschied zwischen eingegossenem und wiedergefundenem Fett konnte in genügender Annäherung als resorbiertes Fett angesehen werden, um so eher, da an jedem Tiere am Vorabend des Versuchs durch Irrigation mit größeren Wassermengen der Dickdarm möglichst leergewaschen wurde.

---

[1]) *Franz Tangl*, diese Zeitschr. **34**, 1, 1911.
[2]) Diese Zeitschr. **158**, 285, 1924.

Die Ergebnisse unserer Versuche.

Ehe wir an die Besprechung unserer Versuchsergebnisse gingen, muß zunächst festgestellt werden, ob die Nüchternwerte, die in jeder Versuchsreihe die Vergleichsbasis zur Beurteilung der Wirkung der Fetteinfuhr auf den Energieumsatz darstellen, plausible sind, also richtig bestimmt wurden. Zu diesem Behufe haben wir in jeder Versuchsreihe die Mittelwerte des pro 1 Minute berechneten O_2-Verbrauchs und der respiratorischen Quotienten ermittelt und konnten aus diesen Daten mit Hilfe des kalorischen Wertes des verbrauchten O_2, der für die verschiedenen Quotienten bei *Magnus-Levy*[1]) zusammengestellt ist, den Energieverbrauch pro 24 Stunden und 1 qm Körperoberfläche berechnen. Diese Werte sind in Tabelle I zusammengestellt; sie enthält auch die mittlere Körpertemperatur in den Nüchternversuchen innerhalb je einer Versuchsreihe.

Tabelle I.

Versuchsreihe	O_2-Verbrauch pro Minute ccm	Respirationsquotient	Energieumsatz pro 24 Stunden und 1 qm Körperoberfläche kg/Cal	Mittlere Körpertemperatur °C
IX	53,6	0,780	885	38,2
X	44,5	0,768	858	37,5
XI	42,5	0,803	892	38,2
XII	53,7	0,772	1013	38,3
XIII	63,9	0,826	1038	39,3
XIV	70,7	0,797	1101	39,5
XV	40,4	0,785	844	38,6
XVI	82,8	0,845	1129	39,3

Wie aus Tabelle I ersichtlich, waren die Nüchternwerte im großen und ganzen ähnlich denen, die wir in unserer vorangehenden Mitteilung erhielten[2]). Wir haben dort ausgeführt, daß diese Werte zwar kaum höher sind, als von vielen anderen Autoren gefunden wurde, jedoch entschieden höher, als zwei von *Graham Lusk*[3]) an hungernden Hunden erhaltene Werte.

Da wir alle Ursache haben, diese *Graham Lusk*schen Werte als die richtigeren anzusehen, muß es eine spezielle Ursache haben, daß wir sowohl in diesen als auch in unseren früher mitgeteilten Versuchen entschieden höhere Werte erhielten. Als eine der möglichen Ursachen haben wir dort angeführt, daß unsere Tiere sich zu Versuchsbeginn vielleicht noch nicht im rechten Hungerzustande befunden hatten, worauf auch der Umstand hinweist, daß die respiratorischen Quotienten in den

[1]) *Magnus-Levy* in Noordens Handb. d. Pathol. d. Stoffwechsels, 2. Aufl., 1, 207.
[2]) l. c.
[3]) Journ. of biol. Chem. 13, 31, 1912/13.

meisten Versuchsreihen höhere Werte aufwiesen, als der Hungerquotient eigentlich zu sein pflegt. Als zweite wichtigere Ursache dürfte folgendes Moment vorliegen. Es ist uns zwar gelungen, die Hunde, die infolge der Curarevergiftung ihrer Temperaturregulierungsfähigkeit beraubt waren, dadurch, daß wir sie während der ganzen Versuchsdauer in einem entsprechend temperierten Thermostaten beließen, bei nahezu gleichmäßiger Körpertemperatur zu erhalten; doch ist es sehr wahrscheinlich, daß in den meisten Versuchsreihen diese, wenn auch konstante Körpertemperatur etwas höher war, als dem Tiere eigentlich zugekommen wäre. Es hatte also wahrscheinlich eine mäßige Hyperthermie bestanden, woraus dann der höhere Umsatz ohne weiteres erklärlich ist. In der Tat läßt sich den Daten der Tabelle I entnehmen, daß der Energieumsatz an vier von fünf Hunden, deren Körpertemperatur 39° C nicht erreichte, unterhalb 900 kg/Cal pro 24 Stunden und 1 qm Körperoberfläche geblieben war; während er an drei anderen Hunden, deren Körpertemperatur sich über 39° C erhob, auch der Energieumsatz 1000 kg/Cal teilweise weit überschritten hatte.

Wenn demnach auch zugegeben werden muß, daß die von uns erhobenen Nüchternwerte — soweit die *Graham Lusk*schen Werte die maßgebenden sind — vielleicht nicht den eigentlichen Grundumsatz der Tiere darstellen, ändert dies nichts daran, daß diese Werte als Vergleichsbasis zur Beurteilung des Einflusses der Fette auf den Energieumsatz verwendet werden können.

Die Ergebnisse unserer Versuche, deren Einzeldaten in den Tabellen am Schluß des Textes folgen, sind aus der Texttabelle II zu ersehen. In diese Tabelle ist die Zu- bzw. Abnahme des pro 1 Minute berechneten O_2-Verbrauchs in Kubikzentimetern eingetragen, und zwar in der Reihenfolge, wie sie von uns innerhalb je einer Versuchsreihe von Versuch zu Versuch konstatiert wurde. Falls in einer Versuchsreihe gegen Ende derselben eine erhebliche Abnahme des Blutdruckes eintrat, was, wie erwähnt, nicht ohne Einfluß auf den Gaswechsel bleibt, haben wir die Ergebnisse der betreffenden Versuche in diese Tabelle nicht aufgenommen. Dasselbe gilt auch in Versuchsreihe XIV, in der der Blutdruck vor der Fetteingießung und auch einige Stunden nachher sehr hoch war, dann aber erheblich, wenn auch nicht unter die Norm, abfiel. Im letzten Stabe ist angegeben, wieviel in jeder Versuchsreihe vom eingegossenen Fette resorbiert wurde.

Nach den Daten der Tabelle II fanden sich also von unseren acht Versuchsreihen *zwei*, Nr. XV und XVI, in denen bald nach erfolgter Fetteingießung eine ausgesprochene *Zunahme* des O_2-Verbrauchs zu konstatieren war; diese Zunahme ward nach einer Weile noch größer und fiel dann wieder ab. In Versuchsreihe XVI, in der die Versuche nach erfolgter Fetteingießung über die 13. Stunde hinaus

Tabelle II.

Versuchsreihe	Änderung des O_2-Verbrauchs pro Minute ccm	Resorbiert
IX	— 3,5, — 1,1, — 2,0, — 2,5, — 0,5, + 3,0, + 3,0, + 4,2	13 g Schweinefett
X	— 0,9, + 0,6, — 1,1, + 1,2, + 2,3	11 g „
XI	— 4,3, — 6,0, — 6,7, — 2,8, ± 0, + 4,2 + 3,3	12 g „
XII	— 1,8, + 2,1, — 1,8, + 3,7, — 0,8, — 0,3 + 2,1, — 0,8	8 g „
XIII . . .	— 1,5, — 4,7, — 4,3, — 5,2, — 3,3	23 g Olivenöl
XIV	— 3,3, — 4,7, — 0,5, — 4,3	16 g „
XV	+ 4,0, + 3,5, + 6,6, + 1,5, + 6,7, + 5,4, + 6,3	27 g „
XVI	+ 4,7, + 5,1, + 2,1, + 1,7, + 5,0, + 4,0, + 3,9, + 1,3, + 2,8, — 0,1, + 2,5 + 0,9, — 0,7, — 1,4, + 0,3, + 0,2, — 1,0	30 g „

fortgesetzt werden konnten, war die Rückkehr zum Normalwert sehr schön zu beobachten.

In Versuchsreihe XII war eine geringe Zu- und Abnahme des O_2-Verbrauchs in beinahe regelmäßiger Abwechslung zu konstatieren, was vielleicht mit dem recht unregelmäßigen Verhalten des Blutdruckes in Zusammenhang gebracht werden kann, indem dieser oft weit höher war als in den Normalversuchen. Da diese Versuchsreihe ein nach keiner Richtung hin klares Ergebnis lieferte, muß sie aus der Besprechung ausgeschieden werden.

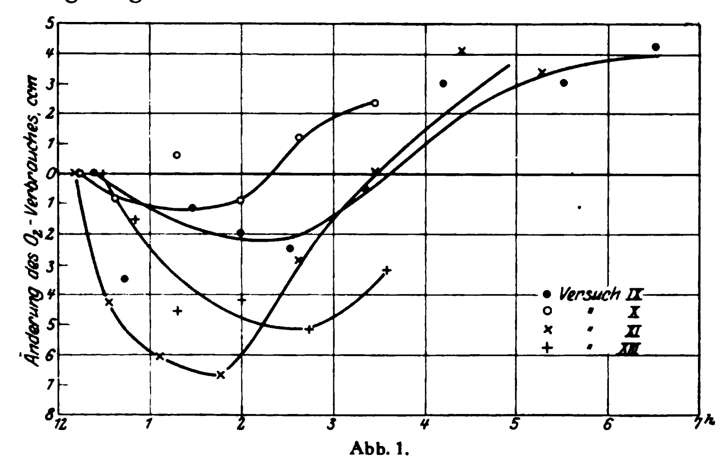


Abb. 1.

In den übrigen fünf Versuchsreihen, und zwar Nr. IX, X, XI, XIII und XIV zeigte der O_2-Verbrauch jedesmal bereits in den ersten der Fetteingießung folgenden Versuchen eine deutliche *Abnahme*, die in den nächsten Stunden noch größer wurde, dann aber, wenigstens in denjenigen Versuchsreihen, die genügend lange fortgeführt werden konnten, einer Zunahme des O_2-Verbrauchs Platz machte.

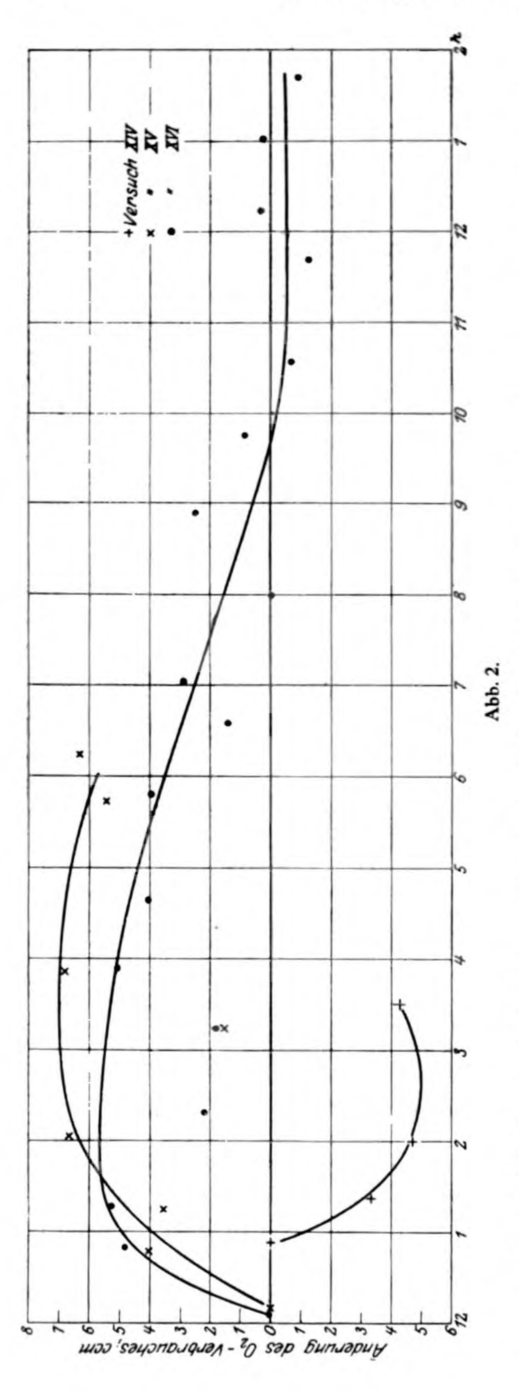


Abb. 2.

Noch klarer als aus diesen Tabellen ist das soeben geschilderte Verhalten des O_2-Verbrauchs aus Abb. 1 u. 2 zu überblicken. Wir haben nämlich innerhalb jeder Versuchsreihe den Zuwachs bzw. den Abfall des O_2-Verbrauchs in den einzelnen Versuchen als Ordinaten in ein Koordinatensystem eingetragen, auf dessen Abszissenachse die Versuchszeiten verzeichnet sind. Durch die Schnittpunkte wurden dann die entsprechenden Kurven gezogen, die ein charakteristisches Bild vom Verlauf des O_2-Verbrauchs liefern. Die Kurven mußten stellenweise weitab von dem einen oder anderen Schnittpunkte vorübergezogen werden; doch wurden gerade hierdurch Werte, die infolge irgend eines unkontrollierbaren Versuchsfehlers entstanden sind und stark aus der Reihe der übrigen Werte sprangen, ausgemerzt. Die auf diese Weise entstandene etwas willkürliche Änderung der Ergebnisse ist in den meisten Versuchsreihen recht belanglos; doch auch, wo sie bemängelt werden könnte, nicht von der Art, daß unsere Schlußfolgerungen hiervon berührt werden könnten.

Es ist sehr auffallend, daß unter unseren acht

Versuchsreihen gerade Nr. XV und XVI es sind, in denen im Gegensatz zu allen übrigen die Hunde auf die Fetteingießung sofort mit einer recht erheblichen Zunahme des O_2-Verbrauchs reagierten; denn diese beiden Versuchsreihen sind es, in denen mehr als in allen anderen vom eingegossenen Fett zur Resorption gekommen war, nämlich 30 und 27 g gegen 23, 16, 13, 11 und 8 g.

Dies, sowie der Umstand, daß in den Versuchsreihen IX, X und XI die anfängliche Abnahme des O_2-Verbrauchs von einer Zunahme gefolgt ist, die in Versuchsreihe IX und X sogar größer ist als die anfängliche Abnahme, lassen vielleicht folgende Deutung zu: *Im eingeführten Fett* (Olivenöl oder Schweinefett) *sind zwei wirksame Prinzipien enthalten.* Eines führt zur *Herabsetzung,* das andere zur *Erhöhung* des Energieumsatzes. Das umsatzhemmende Prinzip ist von der Menge des resorbierten Fettes anscheinend unabhängig und entfaltet seine Wirksamkeit sofort nach Einführung des Fettes. Die Wirkung des anderen, umsatzsteigernden Prinzipes wächst mit der Menge des resorbierten Fettes und ist weit andauernder. Daher kommt es, daß der Energieumsatz nach der Resorption geringer Fettmengen erst herabgesetzt wird, später aber eine Steigerung erfahren kann; während, wenn Fett in größeren Mengen zur Resorption kommt, seine umsatzhemmende Wirkung gleich von vornherein durch die umsatzsteigernde überdeckt wird, daher es auch sofort zu einem Anstieg des Energieumsatzes kommt.

Ob man sich das umsatzhemmende Prinzip nach *Gigon*[1]) so vorzustellen habe, daß die Motilität im Gebiete der Verdauungsorgane durch die eingeführten Fette herabgesetzt wird, oder aber durch das resorbierte Fett Eiweiß aus den Verbrennungen verdrängt wird, soll hier überhaupt nicht zur Erörterung kommen. Auch muß ausdrücklich betont werden, daß unsere Annahme über die Existenz zweier verschieden wirkender Prinzipien im Fett nur eine ganz beiläufige ist und nur als eine mögliche Erklärungsweise aufgefaßt werden soll; um so eher, da eine Lösung dieser Frage nur von Versuchen, in weit größerer Anzahl und unter vielfacher Variierung der eingeführten Fettmengen ausgeführt, zu erwarten ist. Durch Mitteilung der oben beschriebenen Versuche wollten wir zunächst nichts anderes bezwecken, als den Beweis erbringen, daß *Fett, in bestimmten Mengen eingeführt, wohl imstande ist, den Energieumsatz herabzusetzen.* Daß aber diese Herabsetzung nicht etwa durch die Art der von uns angewendeten Versuchsmethodik (Curare) verursacht war, geht aus dem Umstand hervor, daß wir in Dutzenden von Versuchen, die wir auf dieselbe Weise mit Erepton, Casein, Traubenzucker, Fruchtzucker, Stärke ausgeführt

[1]) l. c.

haben, soweit es sich nicht um eine Abnahme des Gaswechsels handelte, die durch den eingangs erwähnten Abfall des Blutdruckes infolge überstarker Curarewirkung verursacht war, niemals ähnliches beobachten konnten.

Ist unsere oben entwickelte Annahme, daß bei Fetteinfuhr neben dem umsatzsteigernden Prinzip auch ein umsatzhemmendes in Wirkung tritt, richtig, so ist es, solange Art und Wirkungsgröße des letzteren nicht einigermaßen genau bekannt ist, *illusorisch, die spezifisch-dynamische Wirkung der Fette ermitteln zu wollen.* Auch die überaus große Verschiedenheit der von verschiedenen Autoren diesbezüglich angegebenen Werte ist auf obige Weise zu erklären.

Die Neuberechnung unserer Versuche wurde auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. *Paul Hári* durchgeführt.

Nr.	Anfang des Versuchs	Dauer des Versuchs	Atemvolumen pro Minute	O_2-Abnahme in der Ventilationsluft	CO_2-Zunahme in der Ventilationsluft	O_2-Verbrauch pro Minute	CO_2-Ausgabe pro Minute	$\frac{CO_2}{O_2}$	Mittlere Körpertemperatur	Blutdruck	Bemerkungen
			ccm	Proz.	Proz.	ccm	ccm		°C	mm Hg	
			Versuchsreihe IX.			Körpergewicht: 7100 g.		Datum: 17. II. 1914.			
1	10h58'	10' 16"	2320	2,35	1,83	54,5	42,4	0,778	38,2	160	
2	11 15	10 15	2318	2,34	1,78	54,2	41,3	0,761	38,2	150	
3	11 38	10 00	2317	2,35	1,84	54,3	42,6	0,785	38,1	150	
4	12 1	10 27	2342	2,21	1,76	51,8	41,2	0,795	38,2	150	
5	12 44	10 00	2364	2,12	1,78	50,1	42,0	0,839	38,2	140	12h24' 38 g Schweinefett eingegossen, hiervon bis zum Ende 13 g resorbiert.
6	1 31	10 11	2343	2,24	1,71	52,5	40,1	0,764	38,1	150	
7	2 00	10 20	2352	2,20	1,76	51,7	41,4	0,802	38,3	150	
8	2 35	10 20	2327	2,20	1,78	51,1	41,4	0,811	38,3	160	
9	3 25	10 5	2349	2,26	1,91	53,1	44,9	0,846	38,1	160	
10	4 15	10 20	2369	2,39	1,90	56,6	44,9	0,794	38,2	160	
11	5 35	10 24	2309	2,45	1,83	56,6	42,2	0,746	38,1	150	
12	6 32	10 7	2281	2,54	1,85	57,9	42,1	0,727	38,4	160	
			Versuchsreihe X.			Körpergewicht: 5600 g.		Datum: 23. II. 1914.			
1	10h55'	11' 27"	2053	2,13	1,55	43,2	31,8	0,725	37,2	100	
2	11 16	10 51	2113	2,20	1,63	46,4	34,3	0,739	37,6	100	
3	11 35	11 16	2120	2,07	1,60	43,9	33,8	0,770	37,6	100	
4	11 58	10 52	2144	2,05	1,58	44,0	33,9	0,770	37,5	110	
5	12 39	10 35	2204	1,98	1,52	43,6	33,5	0,768	37,3	120	12h15' 30 g Schweinefett eingegossen, hiervon bis zum Ende 11 g resorbiert.
6	1 19	10 31	2203	2,05	1,54	45,1	34,0	0,753	37,7	120	
7	1 59	11 7	2135	2,05	1,56	43,7	33,3	0,761	37,7	120	
8	2 40	10 51	2125	2,15	1,58	45,7	33,6	0,736	37,5	110	
9	3 30	10 42	2125	2,20	1,51	46,8	32,0	0,683	37,4	100	
10	4 30	11 28	2044	2,19	1,57	44,8	33,1	0,718	37,2	90	
11	5 47	11 36	2006	2,20	1,55	44,2	31,1	0,703	37,5	120	
12	6 22	11 38	2013	2,14	1,60	43,0	32,2	0,750	37,4	80	

Nr.	Anfang	Dauer	Atemvolumen pro Minute	O_2-Abnahme	CO_2-Zunahme	O_2-Verbrauch	CO_2-Ausgabe	$\frac{CO_2}{O_2}$	Mittlere Körpertemperatur	Blutdruck	Bemerkungen
des Versuches				in der Ventilationsluft		pro Minute					
			ccm	Proz.	Proz.	ccm	ccm		°C	mm Hg	
Versuchsreihe XI. Körpergewicht: 5000 g. Datum: 4. III. 1914.											
1	10h46′	15′57″	1490	2,81	2,15	41,8	32,0	0,766	37,8	100	
2	11 9	15 26	1555	2,95	2,37	45,8	36,9	0,804	38,8	130	
3	11 31	15 43	1485	2,84	2,28	42,1	33,9	0,804	38,2	130	
4	11 54	15 36	1494	2,71	2,27	40,5	33,9	0,837	38,1	120	
5	12 35	16 40	1387	2,75	2,21	38,2	30,6	0,802	38,1	120	12h12′ 26,5 g Schweinefett eingegossen, hiervon bis zum Ende 12 g resorbiert.
6	1 10	17 7	1366	2,67	2,19	36,5	29,9	0,818	38,3	140	
7	1 50	17 21	1353	2,64	2,16	35,8	29,2	0,817	38,2	120	
8	2 40	17 47	1337	2,97	2,55	39,7	34,1	0,858	38,4	120	
9	3 30	16 00	1455	2,92	2,40	42,5	34,9	0,822	38,2	110	
10	4 25	17 42	1335	3,50	2,65	46,7	35,4	0,758	38,5	110	
11	5 20	17 34	1320	3,47	2,48	45,8	32,7	0,715	38,4	100	
12	6 13	19 6	1248	1,98	1,61	24,7	20,1	0,815	37,8	?	Herzschwäche
Versuchsreihe XII. Körpergewicht: 5800 g. Datum: 17. III. 1914.											
1	10h	8′56″	2623	2,04	1,45	53,6	37,9	0,707	38,2	110	
2	10 17′	8 47	2586	2,06	1,51	53,2	39,0	0,733	38,3	110	
3	10 36	8 47	2669	2,00	1,56	53,4	41,5	0,779	38,4	110	
4	10 57	8 24	2714	2,01	1,61	54,6	43,4	0,798	38,3	120	
5	11 32	8 50	2632	1,97	1,59	51,9	41,8	0,805	38,0	140	11h8′ 32 g Schweinefett eingegossen, hiervon bis zum Ende 8 g resorbiert.
6	12 5	8 23	2761	2,02	1,57	55,8	43,5	0,778	38,5	160	
7	1 12	8 31	2737	1,90	1,40	51,9	38,2	0,735	37,9	140	
8	1 36	8 30	2706	2,12	1,42	57,4	38,4	0,669	38,1	120	
9	2 37	8 36	2717	1,95	1,38	52,9	37,6	0,710	38,3	120	
10	3 15	8 33	2729	1,96	1,44	53,4	39,4	0,736	38,3	110	
11	4 10	8 23	2703	2,06	1,46	55,8	39,3	0,705	38,4	160	
12	5 8	8 27	2713	1,95	1,37	52,9	37,2	0,703	38,0	120	

Nr.	Anfang	Dauer	Atemvolumen pro Minute	O_2-Abnahme	CO_2-Zunahme	O_2-Verbrauch	CO_2-Ausgabe	$\frac{CO_2}{O_2}$	Mittlere Körpertemperatur	Blutdruck	Bemerkungen
	des Versuchs			in der Ventilationsluft		pro Minute					
			ccm	Proz.	Proz.	ccm	ccm		°C	mm Hg	
			Versuchsreihe XIII.		Körpergewicht: 7400 g.			Datum 27. III. 1914.			
1	11h10′	13′ 49″	2333	2,78	2,19	64,9	51,2	0,788	39,2	120	
2	11 29	13 43	2335	2,75	2,23	64,1	52,0	0,811	39,3	130	
3	11 51	13 1	2394	2,71	2,29	64,8	54,7	0,844	39,4	120	
4	12 13	13 00	2371	2,61	2,25	61,9	53,3	0,862	39,2	130	
5	12 51	13 00	2409	2,59	2,18	62,4	52,4	0,839	39,3	120	Um 12h28′ 39 g Olivenöl eingegossen, hiervon bis zum Ende 23 g resorbiert.
6	1 18	13 10	2400	2,47	2,08	59,2	49,9	0,843	39,4	120	
7	2 00	13 7	2364	2,52	2,08	59,6	49,1	0,824	39,2	120	
8	2 45	13 00	2415	2,43	1,91	58,7	46,1	0,785	39,3	130	
9	3 35	13 00	2425	2,50	2,01	60,5	48,8	0,805	39,7	120	
10	4 30	13 00	2414	2,61	1,91	63,0	46,0	0,730	39,2	120	
11	6 00	13 34	2324	2,67	1,98	63,9	45,1	0,706	40,1	90	
12	6 37	13 21	2381	2,61	1,83	62,2	43,6	0,700	39,5	80	
			Versuchsreihe XIV.		Körpergewicht: 7800 g.			Datum: 31. III. 1914.			
1	11h18′	14′ 52″	2975	2,30	1,86	68,4	55,2	0,807	39,3	120	
2	12 5	8 2	3028	2,35	1,84	71,2	55,6	0,780	39,5	170	
3	12 19	8 4	3037	2,35	1,94	71,4	58,8	0,823	39,5	180	
4	12 42	8 4	3044	2,35	1,83	71,7	55,6	0,777	39,6	180	
5	1 22	8 18	3044	2,21	1,74	67,4	53,1	0,788	39,4	180	Um 12h52′ 41 g Olivenöl eingegossen, hiervon bis zum Ende 16 g resorbiert.
6	2 00	8 8	3116	2,12	1,79	66,0	55,7	0,844	39,4	180	
7	2 50	8 00	3133	2,24	1,77	70,2	55,6	0,792	39,6	180	
8	3 30	8 03	3163	2,10	1,66	66,4	52,6	0,792	39,6	160	
9	4 15	8 7	3080	2,03	1,56	62,6	48,1	0,768	39,7	130	
10	5 6	8 00	3038	2,02	1,48	61,3	45,1	0,735	39,4	140	
11	6 00	7 56	3015	2,20	1,58	66,3	47,7	0,720	39,6	130	
12	6 55	8 12	2905	2,11	1,47	61,3	42,7	0,697	39,7	120	

Nr.	Anfang	Dauer	Atemvolumen pro Minute	O_2-Abnahme	CO_2-Zunahme	O_2-Verbrauch	CO_2-Ausgabe	$\frac{CO_2}{O_2}$	Mittlere Körpertemperatur	Blutdruck	Bemerkungen
des Versuchs				in der Ventilationsluft		pro Minute					
			ccm	Proz.	Proz.	ccm	ccm		°C	mm Hg	
Versuchsreihe XV.				Körpergewicht: 5000 g.				Datum: 3. IV. 1914.			
1	11h 3′	9′ 16″	2673	1,55	1,18	41,4	31,6	0,762	38,7	110	
2	11 25	8 59	2617	1,49	1,14	39,0	29,7	0,762	38,7	120	
3	11 42	9 7	2640	1,61	1,28	42,4	33,8	0,798	38,5	120	
4	11 59	8 33	2732	1,43	1,13	39,0	30,9	0,792	38,5	110	
5	12 47	8 32	2762	1,61	1,29	44,4	35,7	0,804	38,6	120	Um 12h10′ 27 g Olivenöl eingegossen, hiervon bis zum Ende 27 g resorbiert.
6	1 15	9 00	2697	1,62	1,29	43,7	34,9	0,799	38,8	130	
7	2 4	8 55	2652	1,77	1,26	47,0	33,4	0,709	38,6	120	
8	3 15	8 45	2667	1,57	1,27	42,0	33,8	0,807	38,5	120	
9	3 53	8 29	2739	1,72	1,26	47,1	34,5	0,731	38,6	110	
10	5 43	9 2	2625	1,75	1,22	45,8	32,1	0,700	38,4	110	
11	6 14	9 11	2574	1,81	1,23	46,7	31,6	0,678	38,4	110	
Versuchsreihe XVI.				Körpergewicht: 9700 g.				Datum: 6. IV. 1914.			
1	10h15′	7′ 16″	3278	2,57	2,08	84,1	68,1	0,810	39,2	120	
2	11 8	9 13	3398	2,48	2,04	84,1	69,3	0,824	39,4	120	
3	11 30	9 11	3433	2,36	2,03	81,6	69,8	0,863	39,2	120	
4	11 50	9 00	3468	2,35	1,97	81,4	68,3	0,839	39,2	130	
5	12 49	8 26	3533	2,48	2,09	87,5	73,7	0,842	39,3	150	Um 12h4′ 51,5 g Olivenöl eingegossen, hiervon bis zum Ende 30 g resorbiert.
6	1 18	8 39	3526	2,49	2,03	87,9	71,5	0,814	39,6	140	
7	2 23	9 1	3392	2,50	2,01	84,9	68,1	0,803	39,4	150	
8	3 15	9 00	3398	2,49	2,06	84,5	69,7	0,825	39,4	150	
9	3 55	9 20	3439	2,55	2,04	87,8	70,3	0,800	39,5	140	
10	4 39	9 31	3359	2,59	1,92	86,8	64,4	0,742	39,5	150	
11	5 52	9 12	3417	2,54	1,81	86,7	61,9	0,714	39,6	130	
12	6 38	9 6	3450	2,44	1,78	84,1	61,3	0,729	39,1	130	
13	7 6	9 18	3410	2,51	1,82	85,6	62,1	0,726	39,6	130	
14	7 57	9 7	3406	2,43	1,77	82,6	60,4	0,731	39,4	130	
15	8 54	9 42	3365	2,53	1,85	85,3	62,3	0,730	39,5	120	
16	9 45	9 42	3309	2,53	1,85	83,6	61,1	0,730	39,5	120	
17	10 35	9 44	3265	2,52	1,84	82,1	60,0	0,730	39,5	120	
18	11 42	9 29	3446	2,36	1,68	81,4	57,9	0,711	39,4	120	
19	12 14	9 6	3481	2,39	1,68	83,1	58,6	0,705	39,3	120	
20	1 5	9 18	3495	2,37	1,64	83,0	57,2	0,690	39,5	120	
21	1 45	9 9	3459	2,37	1,63	81,9	56,5	0,690	39,2	120	

Über das Verhalten der Urease gegen Alkohol.

Von

L. Rosenfeld (Charkow).

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 7. November 1924.)

Jacoby und *Sugga*[1]) haben gezeigt, daß man durch Alkoholfällung aus wässerigen Lösungen von Soja-Urease Fermentpräparate gewinnen kann, die zwar in ungelöstem Zustande gut wirksam waren, aus denen aber das Ferment sehr unvollkommen extrahierbar war. Im Alkohol selbst fand sich nur spurweise Ferment. In seiner Arbeit „Über die Adsorption von Ureasen und ihre Wirksamkeit in ungelöster Form" hat *Jacoby*[2]) dann gezeigt, daß auch adsorbierte Urease wirksam ist. Auch mit absolutem Alkohol behandeltes Ferment war gut wirksam, während im Alkohol gelöst Urease in nennenswerter Menge nicht nachweisbar war. Es wurde dann weiter Ferment und Harnstoff für 15 Minuten bei 0^0 zusammengebracht, dann Sediment und Lösung durch Zentrifugieren getrennt. Der Niederschlag wird mit Wasser ausgewaschen und dann mit negativem Erfolg auf Ammoniakbildung geprüft. Es wurde damals daraus geschlossen, daß Harnstoff nicht am Ferment fixiert worden ist. Nach neueren Untersuchungen von *Fearen*[3]) könnte man annehmen, daß der Prozeß nur bis zu Zwischenprodukten vorgeschritten war. Jedoch ist das für die gewählte Versuchsanordnung unwahrscheinlich, da im Abguß der gesamte Stickstoff des zugesetzten Harnstoffs wiedergefunden wurde. Durch Einwirkung von Fermentpulver auf Ammoniumcarbonat wurde keine Abnahme des Ammoniaks beobachtet, was in Übereinstimmung mit der modernen Annahme von Zwischenprodukten steht.

Bayliss[4]) hat dann ähnliche Versuche wie *Jacoby* angestellt und die Bedeutung der Fermentoberfläche betont. Neuerdings hat *Iwanoff*[5])

---

1) Diese Zeitschr. **69**, 116, 1915.
2) Ebendaselbst **74**, 93, 1916.
3) Biochem. Journ. **17**, Nr. 6, S. 800, 1923.
4) Journ. of Physiol. **50**, 85, 1916.
5) Diese Zeitschr. **150**, 108, 1924.

gezeigt, daß die Soja-Urease noch in hochkonzentriertem Alkohol Harnstoff spaltet, daß aber die Ammoniakbildung unter diesen Bedingungen nicht der Harnstoffbildung parallel geht, weil wahrscheinlich der Prozeß länger im Stadium des Zwischenprodukts verweilt.

Auf Veranlassung von Herrn Prof. *Martin Jacoby* habe ich auch einige Versuche gemacht, welche sich auf die Wirkung des Enzyms im alkoholischen Milieu beziehen.

Die Versuche wurden mit Jackbohnen-Urease ausgeführt, alle Proben waren gleichmäßig gepuffert und unterscheiden sich nur durch den Alkoholgehalt, die Versuchszeit war 44 Stunden.

Untersucht wurden Alkoholkonzentrationen von 60, 70 und 80 Proz. Überall hat, wenn auch in abnehmendem Maße, deutliche Harnstoffspaltung stattgefunden, wobei auch die Ammoniakbildung verstärkt ist.

Ich habe dann eine Reihe von Versuchen ausgeführt, um festzustellen, ob die Urease in Alkohol löslich ist. Auf die Wiedergabe der einzelnen Versuche kann verzichtet werden.

Es ergab sich, daß nur Fermentspuren in den etwa 98proz. Alkohol übergehen. Auch durch Zusatz von Cyankalium war keine irgendwie erhebliche Steigerung der Wirkung erreichbar.

Bei der Behandlung mit Alkohol hatten *Jacoby* und *Bayliss* Präparate erhalten, die in Wasser anscheinend unlöslich waren. Solche Präparate würden sich zu Versuchen über Auxokörperbindung eignen, wie sie in der vorigen Mitteilung geschildert worden sind. Mir standen zurzeit nur Präparate von Soja- und Jackbohnen-Urease zur Verfügung, die nach Behandlung mit Alkohol noch in Wasser und in Puffergemisch löslich waren. Es schien, als ob den Präparaten durch den Alkohol Hemmungsstoffe entzogen werden.

Die Versuche werden im Laboratorium fortgesetzt.

Über die Bindung der Auxoureasen an das Enzym.

Von

L. Rosenfeld (Charkow).

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 7. November 1924.)

Durch die Arbeiten *Jacobys* und seiner Mitarbeiter ist bewiesen, daß die Wirkungen der Soja- und der Jackbohnen-Urease durch Auxokörper, wie Cyankalium oder Aminosäuren, verstärkt werden, *Rockwood* und andere Autoren haben diese Beobachtungen bestätigt. Durch Pufferung ist diese Wirkung nicht zu erklären, sie besteht nur zu einem Teile in einem Schutz des Enzyms vor dem Selbstzerfall.

Eine besonders interessante Frage ist bei diesen Untersuchungen bisher noch nicht studiert worden, ob nämlich die Auxokörper sich mit dem Enzym verbinden oder neben dem Enzym bei der Wirkung frei in der Lösung nachweisbar sind. Nur einige Spezialpunkte sind in dieser Hinsicht schon geprüft worden. *Jacoby* und *Umeda*[1]) hatten festgestellt, daß die Soja-Urease aus Ureiden von Aminosäuren kein Ammoniak abspaltet, *Kochmann*[2]) hat es im hiesigen Laboratorium wahrscheinlich gemacht, daß die Calciumwirkung vielleicht wenigstens zum Teil so zustande kommt, daß Calciumkomplexverbindungen des Harnstoffs entstehen. Noch gar nicht untersucht wurde aber bisher die Frage, ob die Auxokörper an das Enzym gebunden werden. Mit dieser Frage habe ich mich auf Anregung von Herrn Prof. *Jacoby* in dieser Arbeit beschäftigt.

Natürlich muß sofort die selbstverständliche und von *Jacoby* stets betonte Einschränkung gemacht werden, die für alle derartige Untersuchungen Geltung hat, daß nicht entschieden werden kann, ob der Auxokörper sich mit dem Enzym im engeren Sinne direkt verbindet oder ob er von dem Komplex aufgenommen wird, in dem das wirksame Enzym als wesentlicher Anteil verankert ist.

---

[1]) Diese Zeitschr. **68**, 23, 1914.

[2]) Ebendaselbst **151**, 259, 1924.

Eine geeignete Methodik für unsere Versuche ergab sich aus den Arbeiten von *Jacoby* und *Shimizu*[1]), an welche sich die ebenfalls im hiesigen Laboratorium ausgeführte Arbeit von *Hosokawa*[2]) anschließt. *Jacoby* und *Shimizu* hatten gefunden, daß man einen Teil der Urease aus ihren Lösungen durch Cholesterin adsorbieren kann. Man gelangt auf diesem Wege zu einem wenig wirksamen Fermentniederschlag, den man aber durch Auxokörper wesentlich in seiner Wirkung verstärken kann. Aus *Hosokawas* Versuchen geht hervor, daß die in der Natur dem Enzym beigegebenen Auxokörper weniger als das Enzym in das Adsorbat gehen, so daß es erklärlich ist, daß man einen unlöslichen, ohne Zufügung von Auxokörpern nur schwach wirksamen Niederschlag erhält. Behandelt man nun diese unlösliche Fraktion mit Auxokörpern und entfernt die Lösung wieder, so muß sich ergeben, ob die künstlichen Auxokörper durch geeignetes Vorgehen an dem Enzymniederschlag fixiert werden.

Die Versuche wurden nach der im hiesigen Laboratorium ständig angewandten Methodik ausgeführt. In jeden Versuchskolben kamen immer 0,3 ccm Olivenöl zum Vermeiden des Schäumens, 0,3 ccm Toluol zum Ausschluß von Bakterienwirkung, 20 ccm 2proz. Harnstoffs. Der Harnstoff, das Ferment und sonstige zugesetzte Substanzen wurden stets in m/15 Phosphatgemisch ($p_H = 7$) gelöst.

Als Grundlage für meine Versuche wurden zunächst die Versuche von *Jacoby* und *Shimizu* und von *Hosokawa* wiederholt und bestätigt, aus denen hervorgeht, daß durch Cholesterin eine sehr geringe Menge an und für sich wirksamen Enzyms niedergeschlagen wird, daß aber durch Auxokörper dieser Niederschlag sehr erheblich aktiviert werden kann.

Die Versuche wurden mit einer 0,16proz. Lösung von Jackbohnen-Urease angestellt.

Es wurden zusammengebracht: 10 ccm Urease, 1 ccm heiß gesättigter alkoholischer Cholesterinlösung und 1 ccm Kochsalz (1 Proz.). Der Niederschlag wird abgesaugt, er kommt mit 10 ccm Pufferlösung und 20 ccm Harnstoff für 20 Stunden in den Brutschrank, in einem Parallelversuch werden 2 ccm Pufferlösung durch 2 ccm Cyankalium (1 Proz.) oder durch Glykokoll (5 Proz.) ersetzt.

	Ohne Cyankalium	Mit Cyankalium
a	6,1	47,4
b	8,0	57,8

	Ohne Glykokoll	Mit Glykokoll
c	6,9	51,2

[1]) Diese Zeitschr. **128**, 103, 1922.
[2]) Ebendaselbst **149**, 363, 1924.

Man sieht also aus diesen Versuchen, daß eine geringe Menge aktiven Enzyms und ein erheblicher Anteil Enzyms, welches erst durch Aktivierung erkennbar wird, sich im Cholesterinniederschlag findet.

Es war nun die Frage, ob die Auxokörper von dem Niederschlag gebunden werden. Zu diesem Zwecke wurde der Cholesterinniederschlag für verschiedene Zeit und bei verschiedener Temperatur mit Pufferlösung, in der Auxokörper gelöst ist, zusammengebracht, nach Abschluß der Versuchszeit wird die Flüssigkeit wieder sorgfältig abgesaugt und dann der so vorbehandelte Niederschlag in gewohnter Weise mit und ohne Auxokörper zum Spaltungsversuch angesetzt.

Vorbehandlung				Spaltungsversuch		
Puffer	Auxokörper	Temperatur °C	Zeit Std.	Puffer	Auxokörper	
			KCN-Versuche.			
8	2	18	1/2	10	—	5,9
8	2	18	1/2	8	2	26
8	2	18	20	10	—	18,6
8	2	18	20	8	2	31,4
8	2	18	44	10	—	5,8
8	2	18	44	8	2	10
—	10	18	2	10	—	19,8
—	10	18	2	8	2	32,3
5	5	18	44	10	—	8
5	5	18	44	8	2	8,5
8	2	37	1	10	—	27
8	2	37	1	8	2	29,4
8	2	37	2	10	—	23,8
8	2	37	2	8	2	26,4
8	2	37	2	10	—	26,0
8	2	37	2	8	2	32,0
—	10	37	1	10	—	18,8
—	10	37	1	8	2	27
			Glykokollversuche.			
8	2	18	1/2	10	—	11,9
8	2	18	1/2	8	2	32,0
8	2	18	44	10	—	10,9
8	2	18	44	8	2	20,1
5	5	18	44	10	—	20,6
5	5	18	44	8	2	23,0
8	2	37	1	10	—	15,2
8	2	37	1	8	2	32,0
8	2	37	2	10	—	17,0
8	2	37	2	8	2	25,8

Die Versuche zeigen mit Sicherheit, daß Auxokörper in den Niederschlag gehen. Von Bedeutung ist die Versuchszeit und die Versuchstemperatur. Bei den Cyankaliumversuchen waren 44 Stunden anscheinend

eine zu große Einwirkungsdauer, 37° für 1 bis 2 Stunden sind offenbar die günstigsten Bedingungen, beim Glykokoll lassen sich auf Grund des vorliegenden Materials keine speziellen Angaben machen. Aber jedenfalls wird auch dieser Auxokörper vom Niederschlag zurückgehalten.

Ganz vorsichtig sind die Befunde so zu formulieren, daß die Auxowirkung auch eintritt, wenn die in Lösung befindlichen Auxokörper entfernt werden.

Sodann haben wir Versuche gemacht, welche feststellen sollten, ob die Bindung der Auxokörper an den Fermentniederschlag bei wechselnder Wasserstoffionenkonzentration verschieden erfolgt. Zu diesem Zwecke haben wir zunächst je 10 ccm (0,16 Proz.) Jackbohnen-Urease mit 1 ccm heiß gesättigter Cholesterinlösung und 1 ccm 1proz. Kochsalzlösung versetzt, den Niederschlag abgesaugt, eine Probe mit 10 ccm Pufferlösung von wechselndem p_H, eine andere Probe mit derselben Pufferlösung, in der 20 mg KCN oder 100 mg Glykokoll gelöst waren, versetzt. Nach 2 Stunden Brutschrank wurde der Niederschlag wiederum abgesaugt und nunmehr für 20 Stunden in üblicher Weise mit 10 ccm Puffer ($p_H = 7$) und 20 ccm Harnstofflösung in neutraler Pufferlösung angesetzt.

p_H	Versuch 1		Versuch 2	
	Hauptversuch	Kontrolle	Hauptversuch	Kontrolle
		Glykokollbindung.		
14,944*)	21,8	6,4	—	—
5,906	21,0	6,5	19,0	7,3
6,239	23,6	6,4	18,0	5,6
6,443	24,5	4,0	22,0	3,9
6,979	20,2	5,0	18,0	3,3
7,381	23,0	6,0	15,2	4,4
7,731	19,5	6,0	18,2	5,8
8,043	—	—	17,8	6,4
8,679*)	—	—	15,0	3,2
		Cyankaliumbindung.		
4,944*)	28,2	4,5	—	—
5,906	21,4	3,0	18,8	4,2
6,239	24,8	7,5	22,8	5,6
6,443	30,2	8,7	23,8	3,2
6,979	21,4	8,7	18,8	3,1
7,381	20,5	10,5	19,8	7,8
7,731	14,0	7,2	15,1	6,5
8,679*)	13,0	4,8	—	—

*) Besonderer Versuch.

Es scheint also die Bindung der Auxokörper an das Enzym bei einem ziemlich breiten Wechsel von p_H erfolgen zu können.

Wenn nun auch feststeht, daß die Auxokörper in den Niederschlag gehen, so ist damit noch nicht die Frage beantwortet, ob sie von dem Enzym bzw. dem Enzymkomplex gebunden werden oder ob sie vielleicht von dem Cholesterin adsorbiert und auf diesem Umwege am Ferment

fixiert werden. Wir haben diese Frage so geprüft, daß wir untersuchten, ob das Cholesterin durch Zusammenbringen mit den Auxokörpern die Fähigkeit der Auxowirkung gewinnt.

Die Beantwortung der Frage wird dadurch etwas erschwert, daß die Anwesenheit von Cholesterin die Ureasewirkung hemmt. Das zeigen sehr deutlich die folgenden Versuche, bei denen eine heiß gesättigte, alkoholische Cholesterinlösung verwandt wurde und immer der gleiche Alkoholgehalt in den einzelnen Proben eingehalten wurde.

In jeder Probe finden sich zehn Fermente, die gleiche Puffermenge und Harnstoffkonzentration.

Cholesterin	Alkohol	Wasser	Ohne KCN	Mit KCN
3	0	—	34,0	109,0
2	1	—	40,8	112,5
1	2	—	48,6	114,0
0	3	—	56,0	118,0
—	—	3	54,0	129,0

Cholesterin hemmt also die Ureasewirkung, in der experimentell in Betracht kommenden Menge von 1 ccm allerdings nicht sehr erheblich, die Alkoholhemmung kommt für die weitere Darstellung nicht in Frage.

Bringt man KCN und Cholesterin in geeigneter Weise zusammen, z. B. 10 Pufferlösung, 1 NaCl, 1 ccm einer gesättigten Cholesterinlösung, die 0,02 g KCN enthält, filtriert den entstehenden Niederschlag ab und setzt zur Lösung und zum Niederschlag Ferment und Harnstoff in der Weise, daß gleiche Flüssigkeitsmenge, dieselbe Konzentration des Ferments, Harnstoffs und der Puffersubstanzen vorhanden ist, so erhält man bei der Lösung den Wert 123, beim Niederschlag nur 29.

Im Niederschlag kann also nicht eine nennenswerte Menge KCN zurückgehalten sein. Unter Berücksichtigung noch weiterer, hier nicht wiedergegebener Versuche ist jedenfalls mit Sicherheit zu sagen, daß KCN in erheblicher Menge nicht vom fermentfreien Niederschlag adsorbiert wird, sondern in der Hauptsache in das Filtrat geht, ein kleiner Teil haftet aber auch am Cholesterin.

Zusammenfassung.

Die Auxokörper der Urease, Cyankalium und Glykokoll, können durch das Enzym oder den Enzymkomplex fixiert werden. Ohne daß damit schon gesagt werden soll, daß das Enzym Auxokörperverbindungen eingeht, ist doch ein weiterer Schritt zur Klärung des Auxokörpermechanismus getan.

Über das Hämoleukolysin des Pankreas und dessen Bezug zum Delezenne-Fourneauschen Lysocithin.

Von

S. Belfanti.

(Aus dem serotherapeutischen Institut zu Mailand.)

(Eingegangen am 11. November 1924.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die zahlreichen Studien über das Pankreas, zu denen die Entdeckung des Insulins Veranlassung gab, beleuchten eindeutig die komplizierte Wirkungsart dieser Drüse bei den Lebensvorgängen und den Chemismus, welchen sie den verschiedenartigen Stoffwechselelementen gegenüber abspielt; wir erwähnen nur ihre lipasische Wirkung auf Fette (Lipase), die proteolytische auf Albuminoide (Trypsin), die amylolytische auf Kohlehydrate (Amylase), die direkt oder indirekt glykämische Wirkung auf Glykose (Insulin) und endlich die hyperglykämische Wirkung (Glucagon nach *Murlin* und *Kimball*; Substanz *Y* nach *Belfanti*), die zwar als direkte Entität noch fraglich erscheint, in ihren Wirkungen jedoch häufig zutage tritt; zu allem diesen gesellt sich nun noch eine hämolytische und leukolytische Substanz von nicht unbedeutendem Einfluß auf Erythrocyten wie auf Leukocyten.

Daß sich im Pankreasextrakt ein Hämolysin vorfindet, ist eine lang bekannte Tatsache: schon 1907 beschrieb *Friedemann* eine in jenem Organ aufgefundene komplexe Substanz mit hämolytischen Eigenschaften. Dieser Forscher stellte aus pulverisiertem Pankreas Extrakte her, welche bei einer Dosis von 0,2 g Hammel-, Kaninchen- und Rinderblutkörperchen sensibilisierten (gerade als ob es sich um einen wirklichen Amboceptor handelte); die so vorbehandelten Blutkörperchen wurden bei Zusatz von Meerschweinchenserum als Komplement sofort aufgelöst.

In einer späteren Mitteilung (die ich zitiere, weil sie das hier behandelte Argument betrifft) behauptet *Friedemann*, daß in den Organextrakten Hämolysine mit verschiedener chemischer Bauart und Wirkungsweise vorkommen: einige darunter nähern sich den Amboceptoren (spezifische Hämolysine), andere den Toxolecithiden (Hämolysine im allgemeinen). Nach *Friedemann* gehört das Pankreashämolysin sicher zur Gruppe jener Hämotoxine, welche von *Preston Kyes* im Kobragift, von *Morgenroth* und *Carpi* im Bienengift nachgewiesen wurden, und es sollen sich solche Hämolysine nicht nur in der äußeren Sekretion gewisser Drüsen vorfinden (wie z. B. im Trypsin), sondern auch in Organen, *denen, wie dem Pankreas, eine*

wichtige Funktion im Stoffwechsel zukommt; gerade so wie Protrypsin durch den Darmsaft, so wird das Hämotoxin durch das Lecithin aktiviert.

Wir wollen in der Folge sehen, auf welche Weise diese *Friedemann*sche Annahme, die nur hypothetisch und nicht experimentell bestätigt ist, auf Grund des Nachweises toxischer chemischer Substanzen im Pankreas zur Wirklichkeit werden kann.

Delezenne seinerseits hatte schon 1904 die Beobachtung gemacht, daß der reine, nicht mit Darmsekret vermischte Saft einer Pankreasfistel an und für sich roten Blutkörperchen gegenüber inaktiv sei, daß er dieselben aber hämolysiert, sobald zu diesem Saft jener der Darmschleimhaut (Enterokinase) zugesetzt wird.

Dieser Versuch beweist also die wichtige Tatsache, daß aus der Verbindung zweier *thermolabiler* Substanzen, dem Pankreassaft und der Enterokinase, ein Hämolysin hervorgeht, welches einer Temperatur von 100° C widersteht und demnach *thermoresistent* ist. Ich will hier nicht näher auf die Frage eingehen, ob frischen Organextrakten eine mehr antihämolytische als hämolytische Wirkung zukommt und ob die in Frage kommenden Hämolysine nicht einzig mit Erscheinungen zellulärer Autolyse Hand in Hand gehen, wie man heutzutage anzunehmen geneigt ist. Ich übergehe gleichfalls die viel umstrittene Frage, ob Hämolysine nur bei Gegenwart von Fettsubstanzen und Lipasen aufzutreten pflegen, wie einige Forscher annehmen, die jedwedes hämolytische Phänomen von lipolytischen Wirkungen (*Bergell*) oder von den davon abstammenden Seifen (*Noguchi*) abhängig machen.

Wir wissen aus begründeten Beobachtungen und Feststellungen, daß Hämolysine unabhängig von lipatischen Prozessen auftreten können (*Limossier*), daß sie jedoch nicht zu trennen sind von den Fettkörpern und namentlich von den phosphorhaltigen Lipoiden, unter denen das *Delezenne*sche Lysocithin das klassische Beispiel ist.

Die von *Kyes* nachgewiesene Lecithin-Kobragiftverbindung, oder Lecithin-Schlangengiftverbindung im allgemeinen, bei welcher das Phosphatid als Bindungsglied zwischen dem roten Blutkörperchen und dem toxischen Protein des Giftes fungiert — Bindungsglied, auf das *Ehrlich* den Begriff des tatsächlichen Vorkommens seiner Amboceptoren stützte —, hat sich im Laufe weiterer Studien als nicht exakt erwiesen. Unterstützt von den chemischen Analysen *Lüdeckes*, die unter *Willstätters* Leitung ausgeführt wurden, konnte *Kyes* nachweisen, daß in dem Kobralecithid nicht mehr Lecithin als solches vorhanden ist, daß vielmehr im Endprodukt (nach *Lüdeckes* chemischer Analyse ein einheitlicher, wohl definierter Körper) ein Fettsäurerest des Lecithins sicher fehlt. In der Tat ergab die Elementaranalyse Werte, die den für Monofettsäurelecithin festgestellten entsprachen, und es konnte *Lüdecke*, in Übereinstimmung damit, in dem Äther, in dem das Lecithid gefällt war, die aus der Toxolecithinverbindung abgespaltenen Fettsäuren nachweisen.

Die Analyse des mittels Kristallisierung gereinigten nativen Kobralecithids berechtigt zur Annahme, daß es sich um ein reines Derivat des Lecithins und nicht um ein Derivat des Kobragiftes handele. *Lüdecke* ist der Meinung, *es werde, vermöge der Wirkung des Kobragiftes, das Lecithin teilweise verseift, ein Prozeß der wahrscheinlich auf Fermentwirkungen des Giftes selbst zurückgeführt werden muß.*

Neuberg und *Rosenberg* haben für Mokassingift und Kobragift Spaltungsvermögen gegenüber verschiedenen Lipoiden nachgewiesen.

Manwaring sowie auch *v. Dungern* und *Coca* glaubten annehmen zu dürfen (ohne jedoch den Beweis dafür zu bringen), es bilde das Schlangengift die hämolytische Verbindung, anstatt, wie *Kyes* annahm, vermittelst der Summe des Giftes mit dem Lecithin, eher durch eine Fermentwirkung, wobei unter Befreiung der nicht gesättigten Fettsäure das Lecithin hydrolysiert und die Ölsäure abgespalten wird, so daß ein ölsäurefreies Lecithin resultiert.

Erst durch die Untersuchungen von *Delezenne* und seinen Mitarbeitern *Ledebt* und *Fourneau* wurde der chemische Nachweis erbracht, daß die hämolytische Substanz einem hydrolytischen Prozeß und nicht der Summe Kobragift—Lecithin ihre Entstehung verdankt.

Das Kobragift entfaltet dem Lecithin gegenüber eine enzymatische Wirkung, dank der das Molekül abgespalten und die Ölsäure in Freiheit gesetzt wird, während die Palmitinsäure gebunden bleibt. Es ergibt sich daraus eine neue, von *Delezenne* und seinen Mitarbeitern als Palmitin-Glycerinphosphoräther des Cholins chemisch definierte Substanz, welche von *Delezenne* Lysocithin (von Lysin und Lecithin) genannt wurde, ein Präparat, das ein ausgesprochenes hämolytisches Vermögen besitzt.

Bei der Extraktion des Insulins in Wasser und Alkohol läßt sich aus dem Pankreas eine wachsartige, in Wasser unlösliche, in 95proz. Alkohol lösliche Substanz gewinnen; dieselbe gibt mit Lackmuspapier eine saure Reaktion und geht in der Hitze, geradeso wie ein Fettkörper, leicht in Lösung über, wobei sie ein öliges Aussehen annimmt. Die genannte Substanz ist reich an Stickstoff und Phosphor, weshalb sie, anstatt zu den Fettkörpern, zu der Gruppe der Lecithine oder, besser, zu den Phosphatiden gerechnet wird.

Wird z. B. das Phosphatid von dem oben gesagt wurde, es gebe mit Lackmuspapier eine saure Reaktion, mit roten Hammelblutkörperchen in Berührung gebracht, so zeigt es *ein nur mäßiges hämolytisches Vermögen*, möglicherweise wegen der Gegenwart von freien Fettsäuren in der wachsartigen Masse; höchstwahrscheinlich handelt es sich dabei um ein Gemisch von verschiedenen lipoidartigen Fettsubstanzen.

In einer früheren Mitteilung hatte ich bereits Gelegenheit, mich mit dieser Substanz zu befassen; ich beschrieb deren toxische und häufig hyperglykämische Wirkung beim Kaninchen und gab ihr die Bezeichnung „Substanz Y“. Was diese Eigenschaft betrifft, verweise ich deshalb auf jene Mitteilung.

Bezüglich der Giftigkeit dieser Substanz läßt sich sagen, daß sie, bei intravenöser Einführung, für alle Versuchstiere toxisch ist, und zwar bei einer Dosis, welche für etwa 2 kg schwere Kaninchen zwischen 0,20 bis 0,25 und 0,05 bis 0,10 ccm schwanken kann. Die intraperitoneale wie die subkutane Einführung sind nicht tödlich.

Charakteristisch ist bei der Vergiftung des Kaninchens mit Substanz Y eine sofort auf die intravenöse Injektion folgende, stark ausgeprägte Dyspnöe: das Tier hat sozusagen Lufthunger. Bei Anwendung

hoher Dosen erfolgt der Tod nach wenigen Minuten unter tonisch-klonischen Krämpfen; werden mäßige Dosen verabreicht, so kann das Tier 2 oder 3 Tage überleben, es zeigt jedoch beständig starke Dyspnöe, bis unter heftigen Konvulsionen der Tod eintritt, der an die Insulinkrise erinnert, obgleich in diesem Falle die Einführung von Glykose den vergifteten Tieren nicht nützen kann.

Bei der Autopsie ist auffällig, daß häufig die Herzschläge noch lange nach dem Tode fortdauern. Das Blut bleibt flüssig; es besteht mitunter *ausgesprochenes Ödem der Lungen, weshalb sich aus den Nasenlöchern eine schäumige, blutig-seröse Flüssigkeit ergießt*. Die Gekrösvenen sind stark infiltriert; in der Bauchhöhle ist ein spärlicher Erguß vorzufinden. Manchmal, bei rasch erfolgtem Tode, bleibt während geraumer Zeit eine kräftige Darmperistaltik bestehen; die Leber ist schwärzlich gefärbt, die Harnblase stets leer.

Bei Meerschweinchen ist zuweilen, nach schnellem Verenden, eine Lunge enorm aufgebläht, so wie es beim typischen Anaphylaxiebefund der Fall zu sein pflegt; zuweilen besteht hingegen ein starkes Ödem.

Wie oben gesagt, soll die in Frage kommende Substanz zu den Lecithinen oder wenigstens zu den Phosphatiden gehören; in der Tat ergaben die wiederholt an verschiedenen Proben angestellten Elementaranalysen für Stickstoff und Phosphor die in der ersten Tabelle niedergelegten Werte. Man kann sich bei der Lektüre überzeugen, daß das Ergebnis für Phosphor ein ziemlich konstantes ist, mit einem Durchschnittswert von ungefähr 0,50 Proz. Für Stickstoff hingegen war ein großes Schwanken zu verzeichnen, und man beobachtete sogar bei Analyse Nr. 4 einen sehr geringen Prozentsatz an Stickstoff, im Vergleich zum Resultate der Probe Nr. 5, welche 2 Tage später an ein und demselben Material angestellt wurde. Der Unterschied beruht sicher darauf, daß die Substanz bei hoher Temperatur aufbewahrt wurde, wenn auch im Trockenschrank.

Tabelle I.
Stickstoff- und Phosphorgehalt der Substanz Y (*Belfanti*).

Nr.	Datum der Analyse 1924	Stickstoff Proz.	Phosphor Proz.
1	29. I.	3,88	0,51
2	5. III.	3,90	0,42
3	6. III.	2,74	0,34
4	17. VI.	2,97*)	0,50
5	19. VI.	0,98*)	0,50
6	20. VI.	1,07	0,56
7	2. VII.	1,33	0,57

*) Zu diesen beiden Analysen die mit einer zweitägigen Pause gemacht wurden, diente ein und dieselbe Substanz.

Wie wir später sehen werden, ist der Stickstoff hierbei höchstwahrscheinlich an eine sich verflüchtigende Base gebunden, was seinen leichten Verlust erklärlich macht.

Bringt man ein Partikelchen dieser Substanz auf rotes Lackmuspapier und läßt einen kleinen Strahl Äther darauf fallen, so ist zu beobachten, daß die Substanz sich auflöst, während sogleich ringsherum ein tief blauer, breiter Hof auftritt, der wiederum rasch verschwindet, um eine bleibende rote Spur zurückzulassen, falls man blaues Papier benutzt; in gleicher Weise färbt sich Lackmuspapier blau und hierauf wieder rot, wenn es in die in einem Reagenzgläschen erwärmte Substanz eingeführt wird.

Die Substanz Y geht also mit einer flüchtigen Base eine lockere Bindung ein.

Nach Behandlung des Pankreas mit heißem Aceton hat *Fränkel*[1]) in diesem Organ eine besondere Base mit vier Methylen am N nachgewiesen.

Die Substanz Y von lipoidartiger Natur ist, wie bereits gesagt, in 95grädigem Alkohol löslich; die Lösung gibt aber eine stark saure Reaktion, zum Unterschied z. B. von der alkoholischen Lösung des Eierlecithins.

Werden zu dieser alkoholischen Lösung 5 bis 6 Teile Schwefeläther zugesetzt, so bildet sich häufig ein weißes, flockiges, reichliches Präzipitat, das sich auf dem Boden des Gefäßes ansammelt; die Menge des resultierenden Niederschlages ist bei den verschiedenen Präparationen nicht die gleiche.

Das Präzipitat gibt nach der Art der starken Basen eine ausgesprochene kräftig alkalische Reaktion, und auch der darüber liegende Äther reagiert noch alkalisch; nach dem Verdunsten färbt letzterer aber blaues Lackmuspapier rot, während die Reaktion des Präzipitats auf rotem Lackmuspapier *beständig alkalisch bleibt.*

Wird das erhaltene Präzipitat durch Zentrifugieren vom Äther getrennt, so zeigt es sich als *sehr leicht löslich in Wasser, löslich auch in Alkohol, sogar in 95grädigem Alkohol;* es ist hingegen *nicht löslich in Äther, in Aceton, in Chloroform,* kurz in den gewöhnlichen Lösungsmitteln von Fetten.

Die Substanz Y besteht demnach aus zwei Teilen: der reichlichere, in Äther lösliche Teil enthält die Fettsäuren der wachsartigen Masse; der andere spärlichere Teil, der in Äther nicht löslich ist, hat bei diesem Studium die meiste Bedeutung.

---

[1]) Bezüglich der Phosphatide von Rinder- und Pferdepankreas siehe die Mitteilungen von *Fränkel* und seinen Mitarbeitern *G. Pari* und *Th. R. Offer* in dieser Zeitschr. **9** und **17**.

Welches Verhältnis zwischen beiden Teilen besteht, ob das einer einfachen Mischung oder jenes einer wirklichen Bindung, kann ich vorläufig nicht sagen.

Dem Äther kommt die Aufgabe zu, die beiden Teile zu trennen und zu differenzieren, oder den einen Teil, der in der Mischung absorbierend wirkt, aufzulösen und somit den anderen in Freiheit zu setzen. Das Aceton besitzt die Fähigkeit, diese Teile aus der alkoholischen Lösung zu fällen.

Die nicht in Äther lösliche Substanz ist in ihren Eigenschaften ziemlich charakteristisch: gleich nach der Fällung ist sie vollständig wasserlöslich; etwas später gelingt die Lösung schwieriger und sie klärt sich erst bei der Hitze. Die betreffende Substanz reagiert nicht wie ein gewöhnlicher Eiweißkörper, d. h. sie gibt weder die *Millon*sche noch die Biuretreaktion.

Bei Zusatz eines Überschusses an Na gerinnt die Substanz und bildet eine durchsichtige, gallertartige, an Agar-Agar erinnernde Masse.

Die chemischen Analysen, die in der unter der Leitung von Dr. *Cazzani* stehenden Sektion für Chemie im Mailänder serotherapeutischen Institut ausgeführt wurden, ergaben folgende Resultate für Stickstoff und Phosphor:

Analyse vom 18. Februar 1924:
Stickstoff . . . . 6,71 Proz.
Phosphor . . . . 3,03 „

Analyse vom 6. März 1924:
Stickstoff . . . . 4,78 Proz.
Phosphor . . . . 1,70 „

Es ergibt sich aus diesen Befunden, daß die beiden Komponenten, Stickstoff und Phosphor, in der mit Äther gefällten Substanz in viel höherem Verhältnis zugegen sind als in der Substanz Y *in toto*.

Da es sich um eine für ein gründliches Studium noch nicht genug gereinigte Substanz handelt, so haben diese Ziffern natürlich keinen analytischen Wert; sie sprechen aber jedenfalls zugunsten der phosphatid- und lipoidartigen Natur derselben.

Bevor ich zum biologischen Studium dieser für uns sehr wichtigen, in Äther nicht löslichen Substanz übergehe, möchte ich bemerken, daß der Ätherrückstand, d. h. jener Teil, der in Äther löslich ist, nach Verdunsten des letzteren für Meerschweinchen und Kaninchen (bei intravenöser Einführung) stark toxisch wirkt und bei diesen Tieren Erscheinungen auslöst, die den nach Einspritzung der Substanz Y *in toto* beobachteten gleichkommen. Das Präzipitat ist hingegen selbst bei einer Dosis von 0,20 cg für 2 kg schwere Tiere ganz wenig giftig, während der in Äther lösliche Teil schon bei Dosen von 0,25 bis 0,20 und darunter

tödlich wirkt. Es sei noch hervorgehoben, daß der Ätherrückstand eine gelbe durchsichtige Flüssigkeit darstellt, die mit Lackmuspapier saure Reaktion gibt.

Nach *Piazza* soll der alkalische Pankreasextrakt stark giftig sein, wobei die Toxizität auf die mit dem Alkohol gefällten Lipoide zurückzuführen wäre. Die genannten lipoidartigen Substanzen lösten beim Meerschweinchen neben toxischen Erscheinungen auch eine Steigerung der Glykämie aus. Nach intraperitonealer Einführung waren die Intoxikationserscheinungen ungefähr die gleichen, wie man sie bei Behandlung mit der Substanz Y beobachtet (Apnöe, Asthenie, Verlust der Reflexe, pulsatorische Herzschläge noch nach 10 Stunden). Nach intravenöser Behandlung der Kaninchen war eine Drucksenkung zu verzeichnen.

Piazza gibt an, daß Alkoholextrakt aus frischem Pankreas bei einer Minimaldosis von 0,34 ccm für 100 g Meerschweinchengewicht toxisch ist.

Biologische Wirkung der mit Äther gefällten Substanz.

Verfolgt man das Verhalten dieser Präzipitate roten und weißen Blutkörperchen gegenüber, so überzeugt man sich von einer typischen, gewaltsamen Wirkung auf diese Blutelemente.

a) Auf Erythrocyten.

Die roten Blutkörperchen sämtlicher zum Versuche herangezogener Tiere (Kaninchen, Meerschweinchen, Hammel, Rinder, Pferde, Schweine, Hühner, Tauben) *werden sofort hämolysiert*, sobald sie mit einer hinreichenden Menge der Substanz in Berührung gebracht werden; es handelt sich also um eine Substanz mit direkt hämolytischer Wirkung. Wie aus Tabelle II ersichtlich ist, schwankt dieses hämolytische Vermögen innerhalb Grenzen von 1 : 5000 bis 1 : 7000, je nach der Reinheit des Produkts, das man aus dem Pankreas erhält.

Bei der Hämolyse geht nicht nur das Hämoglobin, sondern auch das Stroma in die Lösung über und es bleibt ausschließlich eine ganz durchsichtige Flüssigkeit zurück, in welcher sowohl unter dem Mikroskop wie bei Dunkelfeldbeleuchtung von einem Blutelement keine Spur mehr zu sehen ist.

Nur bei Hühnerblutkörperchen bleibt der Kern intakt und läßt sich, ohne Veränderungen aufzuweisen, mittels Zentrifugierung auffangen. Die Substanz ist also wirkungslos dem Nucleus von Hühnerblutkörperchen gegenüber (Tabelle II).

Damit die auflösende Wirkung in ihrer vollen Kraft sich äußern kann, ist es notwendig, die Blutkörperchen gänzlich vom Serum zu trennen; das Serum verzögert oder verhindert das Auftreten der Hämolyse, je nach der Menge, in der es zugegen ist (Tabelle III).

Tabelle II.
Hämolytische Wirkung des Hämoleukolysins.

Hämoleukolysin aus Pankreas, Stammlösung mg 20 pro ccm ccm	Gleichwertigkeit in mg	Hammelblutkörperchen 5 Proz. ccm	Resultat nach 2 Stunden bei Zimmertemperatur
$^1/_{10}$	2	1	— — —
$^1/_{100}$	0,2	1	— — —
$^1/_{500}$	0,4	1	— — —
$^1/_{1000}$	0,02	1	+ — —
$^1/_{1250}$	0,016	1	+ + —
$^1/_{1666}$	0,012	1	+ + —
$^1/_{5000}$	0,004	1	+ + +

— — — vollständige Hämolyse. — — + fast vollständige Hämolyse. + + + keine Hämolyse

Tabelle IV.
Hämolyse mit Hämoleukolysin bei Gegenwart von Eierlecithin.

Hämoleukolysin	Eierlecithin ccm		Hammelblutkörperchen 5 Proz. ccm	Resultate	
				nach Stunden Zimmertemperatur	nach 12 Stunden Eisschrank
1 : 1000	0,25	20 Minuten Zimmertemperatur zwecks Sensibilisierung	1	— — —	— — —
1 : 5000	0,25		1	+ + —	+ + —
1 : 10000	0,25		1	+ + +	+ + +

Es ist ferner zu bemerken, daß die Hämolyse durch Eierlecithin nicht gefördert wird, wie es häufig der Fall ist (zum Unterschied von der hemmenden Wirkung des Cholesterins), sondern daß diese Substanz die Erscheinung beträchtlich verhindert (Tabelle IV).

b) Auf ***Leukocyten.***

In gleicher Weise wie auf rote Blutkörperchen wirkt die Substanz auch auf Leukocyten.

Was in Abhandlungen und Handbüchern, die sich mit der Leukolyse befassen, über dieses Phänomen zu lesen ist, scheint nicht geschaffen, dessen Modalität zu erläutern, zumal der Forscher nicht in der Lage ist, hier, wie bei der Hämolyse, den Ablauf der Erscheinung genau und offensichtlich zu verfolgen.

Bis heute wurde die Leukolyse nur mikroskopisch beobachtet; man sprach sogar eher von leukotoxischen als von leukolytischen Sera. Erstere sollen agglutinierend wirken und eine Lyse hervorrufen, die im Protoplasma nachzuweisen ist, ***während hingegen der Nucleus intakt bleibt*** (*Metchnikoff, Bordet, Besredka*).

Tatsächlich läßt sich die Auflösung der Leukocyten nur mikroskopisch und bei Verwendung geeigneter Färbemittel verfolgen, welche

Tabelle III. Hämolyse mit Hämoleukolysin bei Gegenwart verschiedener Sera.

Lysocithin aus Schlangengift	Hämolyse mit 5proz. Hammelblutkörperchen	Hämolyse bei Gegenwart der Sera von Mensch, Dosis 0,20	Mensch, Dosis 0,10	Pferd, Dosis 0,20	Pferd, Dosis 0,10	Kaninchen, Dosis 0,20	Kaninchen, Dosis 0,10	Meerschwein, Dosis 0,20	Meerschwein, Dosis 0,10	Rind, Dosis 0,20	Rind, Dosis 0,10	Hammel, Dosis 0,20	Hammel, Dosis 0,20
Lösung 1:1000	——— sofort												
Nach 2 Std. Zimmertemperatur		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Nach 12 Std. Eisschrank		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Lösung 1:5000	——— sofort												
Nach 2 Std. Zimmertemperatur		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Nach 12 Std. Eisschrank		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Lösung 1:10000 . . .	——— nach 1 Minute												
Nach 2 Std. Zimmertemperatur		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Nach 12 Std. Eisschrank		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

die veränderte morphologische Struktur der Leukocyten augenscheinlich werden lassen. Wenn man auf die Cytolyse die Aufmerksamkeit lenkte, so geschah es eher aus theoretischer Homologie als auf tatsächliche Beobachtung hin. Handelt es sich um die Bestimmung eines cytolytischen Wertes, so ist dieser Zweck nur auf indirektem Wege zu erreichen (*Gardi* und *Sivori*, *Sisto* und *Jona*).

Vielleicht ist es angezeigt, hier der Arbeiten von *Flexner* und *Noguchi* zu gedenken, bezüglich der Wirkung des Kobra- und Crotalusgiftes auf nach Einspritzung von Substanzen mit positiver Chemotaxis aus der Pleura des Kaninchens entnommene Leukocyten.

Die genannten Forscher beobachteten besonders, daß die so vergifteten Leukocyten ihre Beweglichkeit einbüßten, während letztere bei den Kontrollproben kräftig erhalten blieb. Bei der mikroskopischen Prüfung war die interessante Tatsache zu verzeichnen, daß die großen, körnigen Leukocyten die ersten waren, bei denen strukturelle Veränderungen mit Verlust des Kernes auftraten; ihnen folgten die mittelgroßen Leukocyten und endlich die kleinen Lymphocyten, welch letztere, nach obigen Forschern, der Wirkung des Giftes viel weniger zugänglich sein sollen.

Je nach dem verwendeten Gifte ist die Wirkung eine verschiedene: Kobragift zeigt sich aktiver als Crotalusgift, da ersteres in einer Verdünnung von 2 : 1000 die Leukocyten in 30 Minuten vollständig auflöst, während letzteres in ein und derselben Verdünnung erst nach 2 Stunden zu dem gleichen Resultate führt.

Was bisher gesagt wurde, gilt nur für normale Leukocyten; *bei gewaschenen Leukocyten ist hingegen eine spärliche Leukolyse und das Auftreten von Agglutination zu beobachten.* Die Auflösung findet bei Gegenwart des Komplements statt. Nach oben genannten Autoren sind Leukolysine von den Erythrolysinen verschieden.

Nach meiner eigenen Erfahrung erhält man mit der hämolytischen Substanz aus Pankreas das Phänomen der Leukolyse *in vitro*. Der Ablauf der Erscheinung kann mehr oder weniger Minuten beanspruchen, je nach der zugesetzten Dosis und je nach dem Leukocytengehalt der verwendeten Lösung; bei einer Temperatur von 38 bis 40° C erfolgt die Auflösung rascher.

Kommt eine Leukocytenaufschwemmung zur Anwendung, die nicht zu üppig aber doch reichlich genug ist, um die Flüssigkeit undurchsichtig zu machen, so beobachtet man mit freiem Auge, daß die Blutkörperchen sich zusammenballen, besser gesagt, sich gegenseitig agglutinieren und so stark aneinanderkleben, daß sie ein Gerinnsel aus schleimiger Masse bilden, während die Flüssigkeit sich aufzuklären beginnt. Das Gerinnsel wird mehr und mehr kompakt und gibt nach und nach die es durchtränkende Flüssigkeit ab, gerade so, wie es bei der Koagulation des Plasmas der Fall ist, wo durch Kondensierung des Fibrins das Serum freigegeben wird. Und tatsächlich erinnert dieses Leukocytengerinnsel an Fibrin, wenn es auch nicht die Reaktionen des letzteren gibt; so wird es z. B. durch einen Überschuß an Essigsäure nicht aufgelöst, durch die gewöhnlichen Färbemittel des Fibrins nicht gefärbt.

Die schleimige Masse ist zäh genug, um in dünnen, zur mikroskopischen Prüfung geeigneten Membranen auf dem Deckgläschen ausgebreitet werden zu können.

Unter dem Mikroskop kommt eine homogene, manchmal gleichförmige, manchmal filamentöse Masse zur Erscheinung, in welcher winzige Körnchen, vereinzelte intakt gebliebene Leukocyten und Kernfragmente zerstreut liegen. Zuweilen begegnet man rundlichen Häufchenbildungen (an die frühere nukleäre Ansammlung, von der sie abstammen, erinnernd); diese letzteren bestehen aus viel gröberen Körnchen, welche sich dann gleichfalls in der Flüssigkeit verlieren. Solche Körnchen färben sich leicht und gut mit Anilinfarben, namentlich mit Eosin.

Welcher Abstammung und Beschaffenheit diese körnchenartigen Gebilde sind, die sich bei der Auflösung der Leukocyten unter dem Einfluß der lytischen Substanz in der Flüssigkeit nach und nach ver-

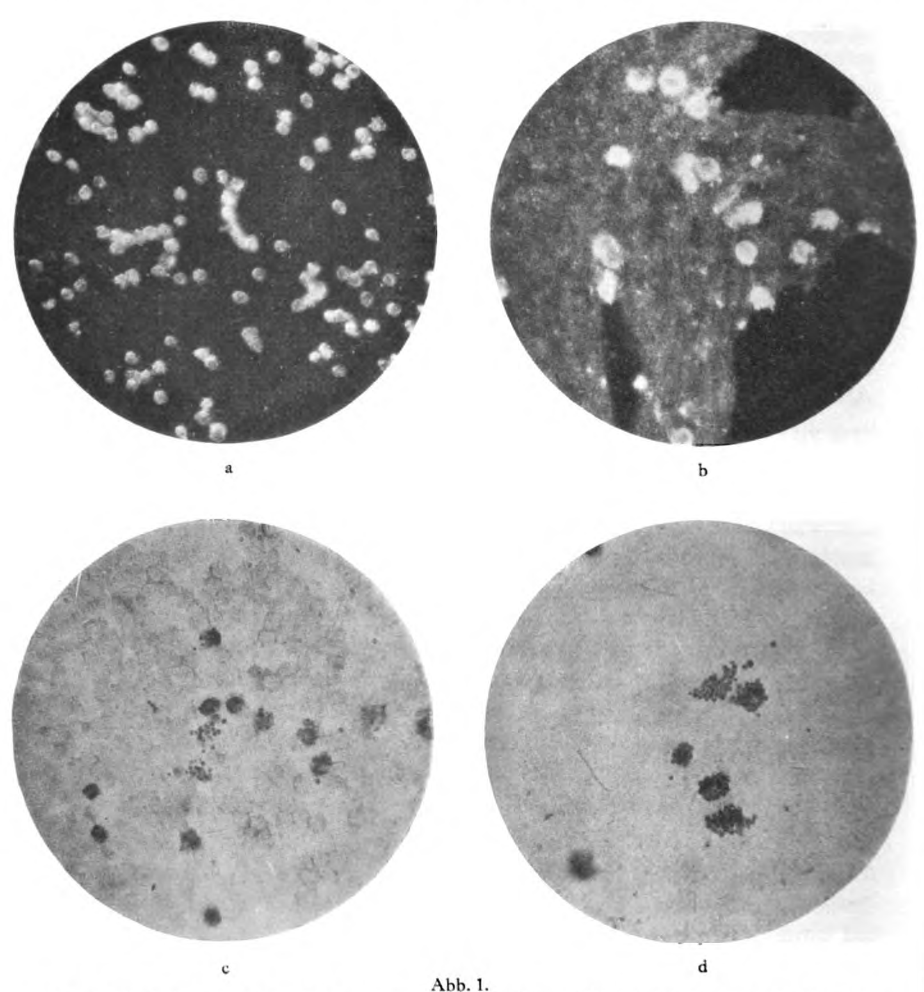


Abb. 1.
a) Normale Leukocyten vom Pferde. (Dunkelfeldbeleuchtung, Obj. 8, Ocul 4 comp.). b) Normale Leukocyten vom Pferde nach Behandlung mit leukolytischer Substanz. (Dunkelfeldbeleuchtung, Obj. 8, Ocul 4 comp.) c) Residuum der Leukolyse mit in Zersetzung begriffenen Kernen. (Methylenblaufärbung, Obj. Apochr. 2 mm homog. Imm., Ocul 4 comp.). d) Körnchen aus der Kernzersetzung. (Methylenblaufärbung, Obj. Apochr. 2 mm homog. Imm., Ocul 4 comp.).

lieren, ist nicht meine Aufgabe, zu erforschen; ebensowenig bin ich imstande, zu sagen, ob dieselben jenen Gebilden entsprechen, die von *Martinotti*, *Fiessinger* und anderen als Träger der oxydasischen Fermente beschrieben wurden.

Ich beschränke mich vorläufig einzig auf den Nachweis dieser leukocytären Zerstörung, welche aus Abb. 1, die keiner weiteren Erläuterung bedarf, ersichtlich ist.

Die von mir verwendeten Aufschwemmungen enthielten Leukocyten verschiedener Herkunft; zumeist stammten sie aber von Pferden, wo sie reichlich und ohne Mühe von Tieren gewonnen wurden, denen man zwecks Herstellung von Immunsera (gegen Diphtherie, Milzbrand, Tetanus usw.) Blut entnahm. Eine weitere Bezugsquelle fand ich in der bei Kaninchen durch intraperitoneale Pepton- oder Bouilloneinspritzung erzeugten Leukocytose. Soll die Erscheinung in ihrer ganzen Evidenz an den Tag treten, so muß, wie ich schon bemerkte, die Dichtigkeit der Leukocytenaufschwemmung dem lytischen Wert der gebrauchten Lösung angepaßt sein (z. B. 1 ccm einer 5proz. Leukocytenemulsion mit $1/4$ ccm der 1proz. Leukolysinlösung).

Sehr bedeutungsvoll ist die Tatsache, *daß diese lytische Substanz die Körperchen der Lymphdrüsen nicht angreift*, was für die verschiedene chemische Konstitution der Lymphocyten gegenüber jener der Blutleukocyten sprechen dürfte. *Die Lymphocyten, zum Unterschied von den Leukocyten, wirken weder agglutinierend, noch koagulierend, noch hämolysierend.*

Übrigens kennt man die zwischen den Pathologen bestehende Streitfrage bezüglich der Herkunft der körnigen Leukocyten und der Lymphocyten; einige Forscher weisen, im Gegensatz zu anderen, die Annahme des Bestehens von Übergangsformen zwischen den einen und den anderen zurück und befürworten die Abstammung von zwei verschiedenartigen Zellformen (*Veratti*).

Die oben beschriebene lytische Reaktion spricht deutlich zugunsten einer chemischen Unabhängigkeit der beiden Zellgewebe.

Zwischen roten und weißen Blutkörperchen scheint hingegen, was einzelne chemische Elemente anbelangt, Affinität zu bestehen; wahrscheinlich aus diesem Grunde kommt das rote Blutkörperchen im Menstruum zur völligen Auflösung, während beim Leukocyten nur die Kompaktheit des Gebildes verändert und zerstört wird.

Nicht selten ist bei der Hämolyse ein gleiches Resultat wahrzunehmen: das Hämoglobin des Blutkörperchens verliert sich in der Flüssigkeit, das Stroma bleibt hingegen intakt (*Bordet*).

Es ist für Immunologen eine bekannte Tatsache, daß die mit roten Blutkörperchen hergestellten hämolytischen Antigene nicht nur lytisch, für arteigene Blutkörperchen, sondern auch leukotoxisch sind und daß, umgekehrt, dem leukolytischen Antikörper auch eine hämolytische Wirkung für Hämatien der Tierart, aus der die Leukocyten stammen, zukommt. So sind, im allgemeinen, cytotoxische Sera bis zu einem gewissen Grade auch hämolytisch.

Es besteht demnach in jeder als Antigen fungierenden Zelle ein Grundbestandteil mit Affinität nur für eine bestimmte andere Zelle.

Die im Pankreas aufgefundene hämoleukolytische Substanz spricht in ihrem Verhalten eindeutig für das Bestehen chemischer Affinitäten zwischen den Geweben der Hämatien und jener der Leukocyten; wahrscheinlich kommen außerdem noch andere Affinitäten zu Geweben oder zu Keimen vor, die bis jetzt dem Studium nicht zugänglich gemacht wurden. Die Feststellung solcher Wechselbeziehungen könnte uns vielleicht über die Erscheinung der Spezifität, in ihrer Abhängigkeit von besonderen chemischen Faktoren, Aufschlüsse bringen.

Vergleichen wir das Hämoleukolysin des Pankreas mit anderen Hämolysinen, so treten unerwartete Beziehungen und Ähnlichkeiten zutage, welche sowohl für den Biologen als für den Immunologen von Interesse sein dürften.

Ich zitierte bereits im ersten Teile dieser Arbeit die Beobachtungen *Friedemanns* bezüglich des Pankreashämolysins und dessen Beziehungen zu den aus Schlangengiften gewonnenen Toxolecithiden.

Sowohl das Pankreashämolysin *Friedemanns* wie das von *Delezenne* studierte Hämolysin unterscheiden sich von dem hier von mir beschriebenen, weil ihnen sozusagen die Funktion eines Amboceptors zukommt: d. h. die Blutkörperchen werden davon nicht direkt beeinflußt, sondern nur sensibilisiert, und es entsteht die Hämolyse ausschließlich nach Zusatz des Komplements und der Enterokinase.

Mehr logisch und natürlich will mir scheinen, in den von mir selbst und von oben genannten Forschern aufgefundenen hämolytischen Substanzen nicht zwei verschiedene Bestandteile zu suchen, sondern sie als eine *eademque res* zu betrachten und die bestehenden Unterschiede nur durch Verschiedenheiten in der Bindungsart mit anderen Substanzen zu erklären, Verschiedenheiten, durch welche die Wirkung den Blutelementen gegenüber verzögert oder beschleunigt werden kann.

Das Hämoleukolysin wäre demnach die Muttersubstanz des Hämolysins, welches, dank seiner lipoiden Natur, bei der Bindung mit Eiweiß- oder Fettsubstanzen in seiner Affinität dem Blutkörperchen gegenüber verändert wird; in der Tat können wir uns bei Gegenwart von Serum oder von Lecithin von einer solchen Veränderung überzeugen.

Die von mir beschriebene Substanz ist mit Sicherheit auch in den Speicheldrüsen vorhanden, obgleich bei meinen Versuchen der Gehalt dieser Drüsen an Hämoleukolysin viel spärlicher war als beim Pankreas. Vielleicht könnte es sorgfältigen Studien gelingen, die betreffende Substanz noch in anderen Organen nachzuweisen; bei der Thymusdrüse wurde der Befund bereits erhoben, wenn auch in sehr spärlicher Menge.

Es scheint mir jedenfalls wichtig, zu ergründen, welche Beziehungen zwischen dem Pankreashämolysin und anderen bekannten Gruppen von Hämolysinen bestehen oder bestehen könnten.

Nähern wir uns zu diesem Zwecke einen Augenblick den Hämolysinen aus Schlangengiften oder aus anderen Giften tierischer Herkunft, wie z. B. aus Bienen, Skorpionen oder Spinnen, die mit den ersteren verwandt sind und insgesamt zu jener Verbindung führen, welche als Toxolecithid bezeichnet wurde, bis die Arbeiten von *Delezenne* und *Ledebt*, *Delezenne* und *Fourneau* feststellten, daß es sich nicht um eine Verbindung, sondern um eine neue chemische Entität handle, welcher sie den Namen „*Lysocithin*" gaben.

Im allgemeinen sind solche Gifte nur für gewisse Blutelemente *direkt hämolytisch*; sie werden es aber bei Zusatz eines Aktivators, wie z. B. Serum oder Lecithin.

Wird Schlangengift oder Bienengift mit Lecithin in Kontakt gebracht, so wird, wie wir wissen, diese Substanz der darin enthaltenen Ölsäure beraubt, und zwar vermöge eines im Gifte selbst vorkommenden Ferments oder Lecithinase. Die von der Ölsäure befreite Mischung stellt ein Hämolysin mit ausgesprochener lytischer Wirkung dar.

Nach *Delezenne* soll Lysocithin in physiologischer Kochsalzlösung außergewöhnlich stark hämolytisch wirken und bei einer Dosis von 0,005 bis 0,01 mg fast momentan 1 ccm einer 5proz. Lösung Blutkörperchen zur Auflösung bringen; die gleiche Substanz soll auch *in vitro* zahlreiche Zellelemente zerstören (?): es handelt sich also um ein Cytolysin im weitesten Sinne des Wortes.

Diese Diastase besitzt demnach das eigentümliche Vermögen, das Lecithin eines einzigen Säuremoleküls zu berauben, und zwar handelt es sich stets um eine nicht gesättigte Säure, im Falle des Eierlecithins z. B. um Ölsäure.

Das Lysocithin enthält sämtliches Cholin der Lecithine, mit einer einzigen Fettsäure, der Palmitinsäure; es ist dieselbe stets gesättigt (*Fourneau*), während die Ölsäure nach erfolgter Giftwirkung *in toto* in die Stammlösung übergeht.

$$\text{Glycerin}\begin{cases} CH^2-O-\text{Palmitinsäure},\\ CH\ \ -O-\text{Ölsäure},\\ CH^2-O-\text{Phosphorsäure}-\text{Cholin}.\end{cases}$$

Außer den oben angeführten biologischen Eigenschaften besitzt Lysocithin nach *Delezenne* und *Fourneau* die folgenden chemischen Merkmale:

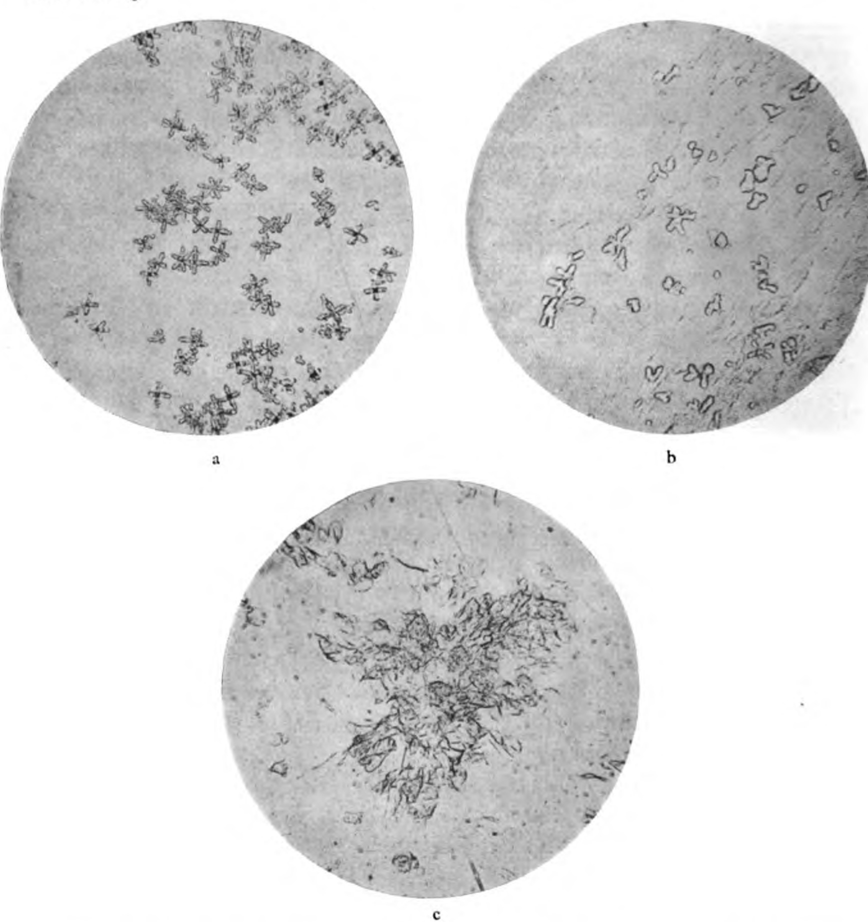
Es stellt einen wohl definierten, kristallisierbaren Körper dar, welcher Stickstoff und Phosphor enthält.

Ist löslich in lauwarmem Wasser und in heißem Alkohol.

Schlecht löslich in Chloroform.

Nicht löslich in Benzin und in Äther.

Gibt mit Lackmuspapier neutrale Reaktion, schmilzt nicht ohne Zersetzung.



a b

c

Abb. 2.

a) Lysocithinkristalle, durch Bienengift, sowie Gift von Crotalus terrificus, Lachesis alternata, Lachesis Neuwedii, aus Eierlecithin gewonnen (bei Fällung mit Äther). b) Lysocithinkristalle in Veränderung begriffen. c) Lysocithinkristalle aus Fällung in physiologischer Kochsalzlösung. (Obj. D. Zeiss, Ocul 4 comp.)

In neutraler Lösung wird es weder mit Goldchlorid, noch mit Kupferchlorid, noch mit Bleiacetat gefällt.

Es gibt nicht die für Cholin charakteristische Reaktion mit Florenceschen Kristallen und geht mit in Wasser emulgiertem Cholesterin keine Bindung ein.

Es ist nicht meine Absicht, an dieser Stelle die Darstellungsmethoden des Lysocithins aus Hühnereiern zu beschreiben, zumal dieselben bereits deutlich von *Delezenne* und *Fourneau*, und, bei Verwendung von Kobragift, von *Fourneau* allein angegeben wurden.

Ich selbst machte bei meinen Versuchen ein vergleichendes Studium der Lysocithine aus Giften von verschiedenen Schlangen Brasiliens, welche mir freundlichst von dem Direktor des serotherapeutischen Instituts zu Butantan, dem ich hier öffentlich meinen Dank ausspreche, überlassen wurden.

Da es aber nicht jedem gegeben ist, über Kobragift oder über andere Schlangengifte zu verfügen, *so schlage ich praktischer als Bezugsquelle das Bienengift vor, aus dem es gelingt, ein ausgezeichnetes, leicht und gut kristallisierbares Lysocithin zu gewinnen.*

Wir wissen aus den Versuchen von *Bertarelli* und *Tedeschi*, und namentlich aus jenen von *Morgenroth* und *Carpi*, daß das Gift von Hummeln und Bienen ein Prolecithid enthält, welches nach den alten Anschauungen als eine Gift-Lecithinverbindung zu betrachten ist. Das Bienengift ist nun aber reich an Lecithinase, weshalb das Prolecithid der oben genannten Forscher an und für sich nicht existiert, da das Gift dieser Insekten sich bei der Bildung des Lysocithins nur auf die Beschaffung des Ferments beschränkt, welches das Eierlecithin spaltet.

Der Zusatz eines einzigen Bienenstachels genügt tatsächlich, um diese Verwandlung, bei einer Temperatur von 50° C, in 12 Stunden zu bewerkstelligen. Das mit Äther als feinster weißer Staub aus der alkoholischen Lösung gefällte Bienenlysocithin bildet schöne, sternförmige Kristalle mit gezackten Rändern (s. Abb. 2a).

Alle von mir geprüften Gifte (von Crotalus terrificus, Lachesis alternata, Lachesis neuwedii, Lachesis lanceolata, von Bienen) *liefern Lysocithine mit gleichen biologischen Eigenschaften und die, in ein und demselben Lösungsmittel, gerade solche Kristalle geben, wie sie aus oben genannter Abbildung ersichtlich sind.*

Das Lysocithin aus Bienenstacheln ergab bei der von Prof. *Contardi* ausgeführten chemischen Analyse die folgenden Resultate:

	gefunden	berechnet
H	10,4	10,29
N	2,8	2,73
p_H	6,0	6,04
C	56,0	56,10

Das hämolytische Vermögen gegenüber gewaschenen Hammelblutkörperchen erreicht den Titer 1 : 10000. Es ist dieses auch für die verschiedenen von mir hergestellten Lysocithine der höchste Titer; diesem hohen hämolytischen Wert entspricht auch der leukolytische Titer.

Zwischen den von Delezenne und Fourneau chemisch und biologisch definierten Lysocithinen und dem an dieser Stelle beschriebenen Hämoleukolysin aus Pankreas bestehen nun nicht nur biologische, sondern auch chemische Berührungspunkte.

Gerade wie dem Lysocithin ist auch dem Hämoleukolysin ein ausgesprochenes hämolytisches Vermögen eigen, wenn es auch nicht die gleiche Höhe wie beim ersteren erreicht (es besteht ein Verhältnis von 1 : 10 und 1 : 5), wahrscheinlich, weil es bisher nicht gelungen ist, das Hämoleukolysin ebenso rein darzustellen, wie das Lysocithin. Es ist übrigens bekannt, daß gewisse Cholinester, so z. B. Palmitin- und Stearinester, in bestimmten Zuständen (als Chloride) weniger lytisch sind als Lysocithin (*Fourneau*). Ausnahmsweise wurde jedoch auch beim Hämoleukolysin ein hämolytisches Vermögen nachgewiesen, das den Titer 1 : 7000 erreichte.

Lysocithin aus Giften führt eine rasche Zersetzung der Leukocyten herbei, in gleicher Weise, wie das auch beim Hämoleukolysin der Fall ist.

Vom chemischen Standpunkt aus gelten die Lösungsmittel des Lysocithins auch für Hämoleukolysin, und es werden beide Substanzen mit den gleichen Verfahren ausgefällt.

Werden die Lösungen der einen wie der anderen Substanz mit Soda stark alkalisch gemacht, so verwandelt sich die Flüssigkeit in eine gallertartige Masse; diese Reaktion, die ich häufig zu beobachten Gelegenheit hatte, wird von den französischen Forschern nicht erwähnt[1]).

Mit Tierkohle werden beide Substanzen gänzlich aus der entsprechenden Lösung adsorbiert. Drehvermögen konnte ich keines wahrnehmen, ebensowenig wie *Delezenne* und *Fourneau* es bei Kobralysocithin beobachteten.

Die chemische Analyse ergab für Hämoleukolysin einen höheren Stickstoff- und einen niedrigeren Phosphorgehalt als es bei Lysocithin aus Gift der Fall war, und zwar:

Lysocithin:	p_H 6,02	2,60 Proz. N	(nach *Delezenne*)
Hämoleukolysin I:	p_H 3,03	6,71 „ N	
„ II:	p_H 1,70	4,78 „ N	
„ III:	p_H 2,00	2,73 „ N	

Es ist meine Absicht, das chemische Studium der Substanz weiterzuführen, um möglicherweise zu erforschen:

ob die in den verschiedenen Hämoleukolysinen vorhandene Glycerinphosphorsäure die gleichen physikalischen und chemischen Merkmale aufweist wie im *Delezenne*schen Lysocithin;

ob die organische Säure, welche eine der alkoholischen Funktionen des Glycerins verestert, auch beim Hämoleukolysin die Palmitinsäure

---

[1]) Höchstwahrscheinlich beruht diese Reaktion auf der Bildung der Natriumseife aus Palmitinsäure; Natriumseife ist gallertartig, was bei Kali- und Ammoniakseife nicht zutrifft.

ist, oder ob es sich eher um irgend eine homologe, ebenfalls gesättigte Säure handelt;

ob es mittels einer weiteren partiellen Verseifung gelingen kann, den Ester der Glycerinphosphorsäure mit der von Fettsäuren freien stickstoffhaltigen Base zu gewinnen;

ob endlich wirklich das Cholin die stickstoffhaltige Base des Hämoleukolysins darstellt.

Versuche, die in dieser Richtung bereits angestellt wurden, führten zu versprechenden Resultaten und geben der Hoffnung Raum, daß es gelingen wird, einen neuen Beitrag zur Kenntnis dieser Phosphatide zu bringen, welche für die Tier- wie für die Pflanzenphysiologie von größter Bedeutung sind.

„Das Lysocithin" — schreibt *Fourneau* — „wurde bisher in normalen Flüssigkeiten und Geweben des Organismus nicht nachgewiesen; es stellt das in seinen Bestandteilen am besten definierte Phosphatid dar. Wegen der typischen physiologischen Eigenschaften und namentlich wegen der hohen Giftigkeit für zelluläre Elemente (hämolytische Wirkung), die vielleicht bei durch Schlangengifte ausgelösten Intoxikationsprozessen in Betracht kommen dürften, verdient diese Substanz das größte Interesse."

Auf Grund meiner eigenen Versuche scheint mir nun aber bewiesen zu sein, daß eine dem Lysocithin gleichartige Substanz in gewissen Drüsen des Organismus vorkommt, und daß dieselbe eine gewaltige Wirkung nicht nur auf rote Blutkörperchen, sondern auch auf Leukocyten ausübt.

Es fragt sich nun: Was für eine Funktion hat diese Substanz im Pankreas und in den Speicheldrüsen?

Ist es angängig, bei Schlangen an das Vorkommen einer Schutz- und Wehrdiastase zu denken, welche bei Einführung in andere Tiere die Nervensubstanz chemisch verändert und dadurch zum Tode führt, so ist immerhin schwerlich anzunehmen, daß eine solche Giftsubstanz, als Produkt endokriner Diastasen, auch in unseren Geweben präexistierend sein kann.

Wir wissen aus vielen Versuchen (von *Preston Kyes*, *Morgenroth*, *Sachs*, *Delezenne*), daß sowohl Kobralecithid als Lysocithin in wässeriger Lösung sich leicht mit Cholesterin binden und daß die resultierende Verbindung nicht mehr hämolytisch ist. Ebenso leicht haftet das Hämoleukolysin dem Lecithin an und wird von letzterem (z. B. von Eierlecithin) adsorbiert, so daß ein nicht mehr hämolytisches Gebilde entsteht.

Sogar durch die Gegenwart von Blutserum wird in einer Blutkörperchenaufschwemmung die Hämolyse verhindert. Diese Tatsache könnte die Unschädlichkeit der betreffenden Substanz im Organismus erklären, in welchem sie zwar präexistieren kann, wo sie aber durch gewisse Bindungen unschädlich gemacht wird.

Jedenfalls scheint mir der Beweis von Wichtigkeit, daß im Pankreas und im Speichel eine Substanz vorkommt, die sich in ihren biologischen und in vielen chemischen Eigenschaften dem Lysocithin nähert, welch letztere Substanz vermöge der einigen Tiergiften eigenen Fermenten aus dem Lecithin entsteht.

Literatur.

S. Belfanti, Intorno ad una sostanza iperglicemizzante negli estratti di pancreas. Rendic. Isti. Lomb. Scienze e Lettre **57**, 1924. — *Bertarelli* e *Tedeschi*, Ricerche sperimentali sul veleno dei calabroni. Riv. d'Ig. e San. Pubbl. 1913, Jahrg. XXIV, Nr. 2. — *Bergell*, Beiträge zur Lehre von der Hämagglutination und Hämolyse. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **27**, 457. — *Besredka*, La leucotoxine et son action sur le système leucocitaire. Ann. Inst. Pasteur 1900. — *L. Bory*, Les phénomènes de destruction cellulaire, S. 95—96. Paris, Ed. Masson, 1922. — *Delezenne*, Action du suc pancréatique et du suc intestinal sur les hématies. C. r. de la Soc. de Biol. 1903, S. 171. — *Derselbe*, Le zinc constituant cellulaire de l'organisme animal. Ann. de l'Inst. Pasteur 1919, S. 121. — *Delezenne* et *Fourneau*, Mémoires, Bull. Soc. Chim. **15/16**, 421. — *Delezenne* et *Ledebt*, Les poisons libérés par les venins aux dépenses du vitellus de l'oeuf. C. r. de la Soc. de Biol. **70**, 1911; siehe auch C. r. Acad. des Sciences **151**, 81; **152**, 760; **155**, 1101. — *Dungern* und *Coca*, Über Hämolyse durch Schlangengift. Münch. med. Wochenschr. 1907, Nr. 47, S. 2317. — *Dieselben*, Über Hämolyse durch Kombination von Ölsäure und Kobragift. Ebendaselbst 1908, S. 105. — *Dieselben*, Über Hämolyse durch Schlangengift. Diese Zeitschr. **12**, 407, 1908. — *Fiessinger*, La reaction des oxidases des leucocites de l'homme. Journ. de Phys. et de Pathol. Génér. 1922, S. 49 bis 58. — *S. Flexner* and *H. Noguchi*, Snake venom in relation to hemolysis and toxicity. Journ. of exper. Med. **6**, Nr. 3. — *U. Friedemann*, Über ein komplexes Hämolysin der Bauchspeicheldrüse. Deutsche med. Wochenschr., 11. April 1907. — *Derselbe*, Über die hämatoxischen Stoffe der Organe. Arch. f. Hyg. **69**, Nr. 2, 1909. — *Funck*, Das antileukozitäre Serum. Centralbl. f. Bakt. **27**, I. Abt., 1900. — *Gardi* e *Sivori*, Gli anticorpi cellulari dimostrati per la deviazione del complemento. Clinica Medica Ital. 1909. — *Kyes-Preston*, Über die Isolierung von Schlangengiftlecithiden. Berl. klin. Wochenschr. 1903, Nr. 42—43. — *Derselbe*, Über die Lecithide des Schlangengiftes. Diese Zeitschr. **4**, 99, 1907. — *Limossier*, Les lipoides dans l'infection et dans l'immunité. Paris, Ed. Baillière, 1920. — *K. Lüdecke*, Zur Kenntnis der Glycerinphosphorsäure und des Lecithins. Inaug.-Diss. München 1905. — *W. K. Manwaring*, Über die Lecithinase des Kobragiftes. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **6**, 513. — *L. Martinotti*, Comportamento delle ossidasi nel pus blenorragico. Arch. per le Science Mediche **42**, Nr. 3—4. — *Metchnikoff*, Etudes sur la resorption des cellules. Ann. Inst. Pasteur. **13**, 1899. — *J. Morgenroth* und *U. Carpi*, Über ein Toxolecithid des Bienengiftes. Berl. klin. Wochenschr., Jahrg. 13, 1906, S. 1424. — *Neuberg* und *Rosenberg*, Berl. klin. Wochenschr. **1907**, Nr. 2. — *H. Noguchi*, The effects of venom upon the blood corpuscles of cold-blooded animals. Univ. of Pensyl. Med. Bull. — *C. Piazza*, Sull'insulina. La Cultura Medica Moderna, Jahrg. III, Nr. 4, S. 99. — *Sisto* e *Jona*, Ricerche sulla citotossina col metodo della deviazione del complemento. Clinica Medica Ital. 1909. — *L. Veratti*, Patologia Generale, S. 116.

Eine quantitative Bestimmung von kleinen Mengen Glykogen in Lösungen.

Von

S. E. de Jongh (Amsterdam) und **J. Planelles** (Madrid).

(Aus dem pharmaco-therapeutischen Laboratorium der Universität Amsterdam.)

(Eingegangen am 20. November 1924.)

Gelegentlich von Untersuchungen im hiesigen Laboratorium, inwieweit andere Kohlehydrate als Glucose geeignet sind, den Krämpfen des Kaninchens nach Insulin entgegenzuwirken, waren neben *Bestimmungen* von Zucker im Blute auch solche von *Glykogen* erforderlich. Die übliche Methode zum Nachweis gelösten Glykogens (mit Hilfe von Jod) war nicht empfindlich genug. Denn man kann beim lebenden Versuchstier nur relativ kleine Mengen Blut abnehmen; deshalb sind die zum Nachweis kommenden Mengen Glykogen, auch selbst bei ziemlich hoher Konzentration, außerordentlich gering.

Ohne große Erwartung haben wir versucht, die übrigen Stoffe, die in der histologischen Technik zum Nachweis von Glykogen benutzt werden, für unseren Zweck zu gebrauchen; jedoch ohne Erfolg. Dies ist auch leicht zu verstehen: reagieren diese Stoffe doch nicht, wie das Jod, irgendwie mit dem Glykogen, sondern sie färben nur die Glykogenkörner stärker als das umliegende Protoplasma. So kamen wir dazu, ein Verfahren zu versuchen, womit man sicher nicht spezifisch allein Glykogen nachweisen kann, aber vielleicht doch in praxi in ausreichender Weise, und zwar benutzten wir die Trübung, die beim Zufügen von Alkohol zu einer glykogenhaltigen Lösung entsteht. Da nun enteiweißtes normales Blutfiltrat mit Alkohol keine Trübung gibt, war die Reaktion für unseren Zweck spezifisch genug.

Mischt man gleiche Teile Glykogenlösung und 96proz. Alkohol (etwas besser, aber teurer: absoluten Alkohol), so entsteht ein Niederschlag, eine Trübung oder nur eine Opaleszenz, je nach dem Glykogengehalt. Läßt man aber den Alkohol vorsichtig an den Wänden des Glases herabfließen, so entsteht an der Grenzschicht beider Flüssigkeiten ein schöner Ring. Dieser Ring setzt sich scharf von den beiden ganz klaren Flüssigkeiten ab;

es kommen praktisch ja nur so verdünnte Glykogenlösungen in Betracht, daß Glykogen an sich keine Trübung gibt. Der Ring ist gerade noch zu sehen bei einer Glykogenlösung $^1/_{30\,000}$.

Unsere ursprüngliche quantitative Bestimmung war also folgende: Die Glykogenlösung unbekannter Konzentration bzw. das eiweißfreie Blutfiltrat (über die zum Enteiweißen benutzten Methoden s. unten) wurde in zunehmender Verdünnung mit Alkohol versetzt, und es wurde festgestellt, bei welcher Konzentration noch eben ein Ring zu sehen war. Wir wußten dann, daß in dieser letzten Lösung Glykogen $^1/_{30\,000}$ enthalten sei, und konnten mittels Umrechnung den Gehalt in der ursprünglichen Flüssigkeit bestimmen. Diese Methode hatte mehrere Nachteile.

1. Jede Bestimmung erfordert viel Arbeit, indem nacheinander die Reaktion mit verschiedenen Verdünnungen ausgeführt werden muß.

2. Die Bestimmung gründet sich auf einen eben noch sichtbaren bzw. gerade verschwindenden Ring, ist also sicher nicht einwandsfrei, um so mehr, als die Grenzschicht zweier Flüssigkeiten sowieso schon einen optischen Effekt im Sinne eines Ringes zeigt.

Wir schüttelten darum das Gemisch aus Glykogenlösung und Alkohol mit *Äther* im Übermaß. Dabei scheidet sich unten im Glase eine trübe Wasserphase aus. Darüber befindet sich eine klare Mischung von Äther und Alkohol. Die Trübung unten ist viel stärker, als wenn man einfach zu derselben Glykogenlösung Alkohol ohne weiteres hinzufügt; das beruht zum Teil auf der Tatsache, daß das Volumen auf die Hälfte vermindert ist. Ferner ist die Trübung proportional dem Glykogengehalt; Konzentrationsunterschiede von 25 Proz. sind so zweifellos sichtbar zu machen. Hierauf gründet sich unsere endgültige Methode zur quantitativen Glykogenbestimmung.

Man nimmt eine Reihe gleich weite, kleine Reagiergläser, die vollkommen sauber und trocken sind. In jedes Glas kommt 1 ccm Glykogenlösung von bekannter, abnehmender Konzentration, außerdem 1 ccm Alkohol und 5 ccm Äther. Man schüttelt und läßt ruhig stehen. Unten in den Gläsern bildet sich eine mehr oder weniger trübe Schicht. Man erhält so eine für einige Stunden konstante Skala. Eine Bestimmung gelingt nun weiter fast ohne Arbeit: 1 ccm Probelösung wird mit Alkohol und Äther geschüttelt, und nach 10 Minuten (während deren die Trübung meist noch etwas zunimmt) bestimmt man den Platz des Probeglases in der Reihe.

Für den gewöhnlichen Gebrauch genügte eine Genauigkeit von 50 Proz. Das bedeutet eine große Arbeitsersparnis beim Verfertigen der Skala, da man in diesem Falle sich beschränken kann auf Gläser mit je halb so schwachen Konzentrationen: $^1/_{1000}$, $^1/_{2000}$, $^1/_{4000}$ usw. bis $^1/_{128\,000}$.

Eine derartige Reihe ist leicht zu machen.

Die Grenzkonzentration, bei welcher z. B. von sechs beliebigen Personen fünf noch Unterschiede zu sehen angaben gegenüber Aqua dest. oder enteiweißtem Blutfiltrat, ist $^1/_{128\,000}$.

Vorteile dieser modifizierten Methode sind:

1. Die Empfindlichkeit ist um das Vierfache gestiegen.

2. Man kann Unterschiede in Opaleszenz in zwei Gläsern vollkommen genau feststellen (am besten vor einem dunklen Hintergrunde) und wird dabei nicht von einer Grenzschicht wie bei der Ringreaktion gestört.

3. Hat man einmal eine Skala (diese ist, wenn 50 Proz. Genauigkeit genügt, ausgehend von einer 1 prom. Glykogenlösung, in 5 Minuten herzustellen), so kann man stundenlang ohne Mühe eine beliebige Zahl Bestimmungen machen. Ein Nachteil, wenn man mit kleinen Mengen Flüssigkeit arbeitet, ist aber, daß die Trübung *unten* entsteht, d. h. in der Rundung des Glases. Um dies zu beseitigen, versuchten wir statt Äther Chloroform zu verwenden, das, mit Alkohol gemischt, schwerer ist als Wasser. Dabei entstanden aber störende Trübungen.

Hier folgen die Ergebnisse einiger Bestimmungen. Die Glykogenlösungen waren von einer dritten Person bereitet.

Lösung	Gehalt an Glykogen	Gefunden	Lösung	Gehalt an Glykogen	Gefunden
1	$^1/_{150\,000}$	$^1/_{>128\,000}$	6	$^1/_{30\,000}$	$^1/_{32\,000}$
2	$^1/_{25\,000}$	$^1/_{30\,000}$	7	$^1/_{45\,000}$	$^1/_{45\,000}$
3	$^1/_{75\,000}$	$^1/_{80\,000}$	8	$^1/_{125\,000}$	$^1/_{>128\,000}$
4	$^1/_{50\,000}$	$^1/_{60\,000}$	9	$^1/_{50\,000}$	$^1/_{64\,000}$
5	$^1/_{110\,000}$	$^1/_{128\,000}$	10	$^1/_{100\,000}$	$^1/_{128\,000}$

Alles bisher Besprochene gilt ohne Vorbehalt für Glykogen in Aqua dest. Für Bestimmungen *im Blute* brauchten wir ein eiweiß- und farbstofffreies Filtrat. Am leichtesten und besten bekamen wir dies durch Zusatz eines gleichen Volumens 25 proz. Trichloressigsäure und nachherigem Filtrieren durch ein angefeuchtetes Faltenfilter. Glykogen geht dabei, wie sich durch besondere Versuche ergab, quantitativ ins Filtrat.

Enteiweißung mit Natriumwolframat und Schwefelsäure, das wir immer benutzen bei der Zuckerbestimmung nach *Folin* und *Wu* und darum zuerst versuchten, ist ungeeignet: es geht immer Glykogen im Filter verloren.

Da man mit kleinen Flüssigkeitsmengen arbeitet, macht man beim Anfeuchten des Filters leicht einen Fehler, der nicht ganz zu vernachlässigen ist. An Stelle des Filtrierens zentrifugierten wir deshalb. Das geht aber nur bei sehr niedrigem Gehalt an Glykogen. Sobald die Flüssigkeit an sich auch nur die leichteste Opaleszenz zeigt, werden

offenbar Glykogenteilchen mit ins Zentrifugat geschleudert; denn eine zentrifugierte Flüssigkeit ist immer bedeutend glykogenärmer als ein damit übereinstimmendes Filtrat.

Mit unserem eben beschriebenen Verfahren war es z. B. möglich, den Blutglykogengehalt zu bestimmen bei Kaninchen, die während Insulinkrämpfen 1 g Glykogen intravenös erhalten hatten. Bei Verwendung von Glykogen bestimmter Herkunft erholte ein derartiges Tier sich nicht und hatte nach 1 Stunde noch einen Glykogengehalt im Blute von $^1/_{800}$.

Wahrscheinlich ist unsere Methode nicht nur für Blutfiltrat, sondern auch für Organpreßsaft geeignet, wie wir aus einer Bestimmung an einem zerriebenen Stück Leber von einem in Insulinkrämpfen gestorbenen Kaninchen sehen konnten. Doch sind hierfür noch weitere Untersuchungen erforderlich.

Es ist wohl zu erwarten, daß Anwendung des Nephelometers nach *Kleinmann*[1]) die Genauigkeit der Methode noch bedeutend steigern wird.

Zusammenfassung.

Eine Mikrobestimmung von Glykogen in Lösung, bestehend in Hinzufügen des gleichen Volumens Alkohol und Ausschütteln mit Äther, wird beschrieben. Die quantitative Schätzung erreicht man durch Vergleichung der Trübung mit einer ad hoc hergestellten Skala. Die Grenzkonzentration der Bestimmung ist $^1/_{128000}$.

---

[1]) Diese Zeitschr. **99**, 115, 1919 und **137**, 144, 1923.

Versuch einer maßanalytischen Bestimmung des SO_4-Ions in kleinsten Mengen.

Von

K. Klinke.

(Aus der Universitäts-Kinderklinik zu Breslau.)

(Eingegangen am 21. November 1924.)

Die Vorteile, welche eine maßanalytische Methode bezüglich der Möglichkeit weitgehender Verfeinerung gegenüber einer gravimetrischen besitzt, ließen es wünschenswert erscheinen, eine solche Bestimmungsweise auch für das SO_4-Ion zu finden. Die leitende Absicht war, an Hand einer solchen Methode die Bedeutung des $SO_4^{=}$, die ja nach *Meyer-Bisch*[1]) nicht gering ist, zu ermessen und seinen Stoffwechsel in humanen Körperflüssigkeiten zu verfolgen.

Die schon bestehenden sogenannten Mikromethoden erfordern zum Teil eine komplizierte Apparatur [*Pregl*[2])], zum Teil sind sie sehr langwierig und umständlich, wie die turbidimetrische von *Denis*[3]). Von den vorhandenen maßanalytischen Makromethoden, die sich bis auf die neueste von *Jellinek*[4]) nicht durchzusetzen wußten, erschienen sowohl diese wie auch die von *Mohr*[5]), *Klemm*[6]) und *Wildenstein*[7]) infolge ihrer ungenauen Nullpunktsbestimmung (Ausbleiben einer Trübung) für einen weiteren Ausbau ungeeignet. Voraussetzung für hinreichende Genauigkeit war, daß die Titration jodometrisch zu Ende geführt werden konnte. Auf diesem Wege hat nur *Andrews*[8]) das Problem der titrimetrischen $SO_4^{=}$-Bestimmung gelöst.

---

[1]) *Meyer-Bisch*, diese Zeitschr. **122**, 120; Zeitschr. f. klin. Med. **94**, 237 und 516.

[2]) Mikromethoden *Pregl*, Abderhaldens Handb. d. Bioch. Arb.

[3]) Journ. of biol. Chem. **49**, 311.

[4]) *Jellinek* und *Czerwinski*, Zeitschr. f. anorgan. u. allgem. Chem. **130**, 263, 1923.

[5]) *Mohr*, Zeitschr. f. analyt. Chem. **8**, 122.

[6]) *Klemm*, ebendaselbst **1**, 432.

[7]) *Wildenstein*, Ann. d. Chem. **90**, 165.

[8]) *Andrews*, Amer. Chem. Journ. **2**, 567.

Er geht folgendermaßen vor: Zu der unbekannten $SO_4^=$-Lösung wird eine essigsaure $BaCrO_4$-Lösung im Überschuß zugefügt. Nach Neutralisation mit Ammoniak oder Calciumcarbonat wird filtriert und das in Freiheit gesetzte $CrO_4^=$ im Filtrat jodometrisch bestimmt. Diese Methode leistet bei schnellem Arbeiten und bei relativ großen Mengen $SO_4^=$ Hinreichendes. Sie muß versagen, wenn zwischen Neutralisation und Filtration längere Zeit verstreicht, und wenn es sich um kleine und kleinste Mengen $SO_4^=$ handelt.

Denn der durch die Neutralisation entstandene Bodenkörper, das Gemisch $BaSO_4$ und $BaCrO_4$, ist nicht absolut unlöslich. Nach dem Massenwirkungsgesetz werden von ihm Ba^{++}-, $SO_4^=$- und $CrO_4^=$-Ionen in die obenstehende Flüssigkeit ausgesandt, die sich mit den im Überschuß befindlichen freien $CrO_4^=$-Ionen wieder in ein Gleichgewicht umsetzen. Hierdurch wird aber das stabile Gleichgewicht des Bodenkörpers verändert, so daß neue ionisierte Teilchen in Lösung gehen und sich dort wiederum umsetzen. Die Geschwindigkeit dieses Vorganges ist entsprechend der geringen Löslichkeit von $BaSO_4$ (Lp. $1{,}2 . 10^{-10}$) und $BaCrO_4$ (Lp. $2{,}3 . 10^{-10}$) sehr gering, immerhin — wie ein Versuch überzeugte — meßbar.

10 ccm n/10 K_2SO_4-Lösung ergaben bei der Titration nach *Andrews* bei sofortiger Filtration die Werte von a) 14,85, b) 14,85, c) 14,90 ccm n/10 $Na_2S_2O_3$; bei Titration 18 Stunden nach erfolgter Neutralisation: a) 11,80, b) 11,90, c) 11,90.

Bei kleinen $SO_4^=$-Mengen wird das Verhältnis zwischen der zu bestimmenden Menge und der Umsetzungsgeschwindigkeit noch ungünstiger.

In dieser Form war also die Methode zum Ausbau zu einer Mikromethode ungeeignet.

Aus den obigen Überlegungen heraus ergab sich aber der Weg, auf dem das Problem gelöst werden konnte. Die Umsetzung des Bodenkörpers über den ionisierten Teil mußte schließlich, wenn alle einwirkenden Kräfte sich ins Gleichgewicht gesetzt hatten, zu einer eindeutigen und endgültigen, berechenbaren Zusammensetzung des Niederschlages wie der überstehenden Flüssigkeit führen. Dieser Ausgleich war momentan zu erreichen, wenn einem neutralen Gemenge von SO_4- und CrO_4-Ionen Ba-Ionen (wobei $SO_4^= + CrO_4^= > Ba^{++}$) zugeführt wurden.

Auf diesem Prinzip wurde aufgebaut.

Wechselnde Mengen von n/10 K_2SO_4-Lösung mit dem log Titer 01274 wurden als Testobjekt benutzt und kamen in Maßkölbchen von 30 ccm Inhalt. In jedes dieser Kölbchen wurden 10,0 ccm einer n/10 K_2CrO_4- (enthaltend 9,721 g) Lösung hineinpipettiert, gründlich umgeschüttelt, und schließlich kamen 10,0 ccm einer n/10 $BaCl_2$-Lösung, die genau gegen die K_2CrO_4-Lösung eingestellt war, hinzu. Nach

kurzem Stehen wurde aufgefüllt, in ein trockenes, etwa 50 ccm fassendes Zentrifugenglas übergeführt und 20 Minuten lang bei hoher Geschwindigkeit zentrifugiert. Von dem ganz klaren Überstand wurden 20,0 ccm abpipettiert und nach Ansäuren und Zusatz von 10 ccm 10proz. KJ-Lösung das in Freiheit gesetzte Jod mittels Titration mit n/100 $Na_2S_2O_3$ bestimmt. Die Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter n/100 $Na_2S_2O_3$ gaben nach Division durch 10 direkt die Anzahl der in Lösung befindlichen Kubikzentimeter n/10 K_2CrO_4.

Diese Berechnung ergibt sich daraus, daß 1 Mol $K_2Cr_2O_7$ = 2 Mol K_2CrO_4 in saurer Lösung 6 Atome Jod frei macht. Da aber für die Fällungsanalyse nur das halbe Molgewicht von K_2CrO_4 das Äquivalent darstellt, so ist 1,0 ccm einer solchen normalen Lösung gleich 1,50 ccm einer oxydimetrischen Normallösung.

Lange Versuchsreihen ergaben durchweg gut übereinstimmende Resultate, von denen hier nur einige angeführt werden.

Tabelle I.

n/10 K_2SO_4-Lösung ccm	Verbrauch n/100 $Na_2S_2O_3$ ccm	n/10 K_2SO_4-Lösung ccm	Verbrauch n/100 $Na_2S_2O_3$ ccm
1	9,05	0,5	5,00
	9,05		5,05
	9,10		5,00
2	14,60	0,2	2,25
	14,55		2,25
	14,55		2,25
5	28,55	0,1	1,40
	28,55		1,40
	28,60		1,35
10	41,40		
	41,45		
	41,40		

Tabelle II. Versuche mit n/200 Lösungen, Titration mittels Mikrobürette log Titer K_2SO_4-Lösung 98274. Versuchsanordnung analog Tabelle I.

n/200 K_2SO_4-Lösung ccm	Verbrauch n/200 $Na_2S_2O_3$ ccm	n/200 K_2SO_4-Lösung ccm	Verbrauch n/200 $Na_2S_2O_3$ ccm
1	0,87	10	4,04
	0,88		4,04
	0,87		4,04
2	1,40	0,5	0,47
	1,40		0,47
	1,39		0,47
5	2,75	0,2	0,22
	2,74		0,22
	2,76		0,21
7	3,41	0,1	0,13
	3,43		0,14
	3,42		0,13

Versuche, die Zusammensetzung des Niederschlages auf arithmetischem Wege entsprechend den Formeln

$$\frac{(Ba^{++})\,(SO_4^{=})}{(Ba\,SO_4)} = k_1$$

$$\frac{(Ba^{++})\,(Cr\,O_4^{=})}{(Ba\,Cr\,O_4)} = k_2$$

und als Endformel

$$(SO_4^{=}) = \frac{k_1\,(Ba\,SO_4)\,(Cr\,O_4^{=})}{k_2\,(Ba\,Cr\,O_4)},$$

wobei $Cr\,O_4^{=}$ mittels Titration bestimmbar, $Ba\,Cr\,O_4$ aus der angewandten Menge $K_2Cr\,O_4$ minus des in Lösung befindlichen Teiles berechenbar und $Ba\,SO_4$ gleich der angewandten Menge $Ba\,Cl_2$ minus der Menge $Ba\,Cr\,O_4$ (in Äquivalenten) ist, zu bestimmen, schlugen fehl, da ein unbestimmbarer Faktor den Wert von k_1/k_2 stetig sinken ließ.

So mußte der andere Weg beschritten werden und die Funktion aus vielen Einzelresultaten graphisch konstruiert werden. Zur Festlegung der Kurve von 0,1 bis 6,0 ccm wurden 38 Bestimmungen gemacht.

Die erhaltene Kurve stellte sich als eine sehr regelmäßige Linie dar, die nur geringe Korrekturen erforderlich machte. Zur Berechnung der Resultate sind die graphisch gewonnenen Titrationswerte zahlenmäßig in der gleichen Normalität für 10 ccm $K_2Cr\,O_4$ und äquivalent 10 ccm $Ba\,Cl_2$ in einer Tabelle angegeben. Bei Verwendung anderer Mengen können die Titrationswerte durch Proportionalgleichung leicht errechnet werden.

Kritik der Methode.

Mit Hilfe dieser Methode ist man imstande, Bestimmungen bis zur Größenordnung von 0,01 mg S titrimetrisch durchzuführen. Das bedeutet anscheinend keine erhebliche Verfeinerung gegenüber der gravimetrischen Methode; doch darf man nicht übersehen, daß eben Gesamtniederschlagsgewichte von 0,1 mg, die schon 0,02 mg S entsprechen, auf der analytischen Wage nicht mehr wägbar sind[1]). Ferner wirken die mannigfachen Manipulationen, die bei der Gewichtsanalyse nötig sind, sicherlich noch nachteilig auf solch geringe Mengen ein. Erfordernis für die Richtigkeit der Bestimmungen ist, daß die Kaliumchromat- und Bariumchloridlösung genauestens aufeinander eingestellt sind. Jede Verschiebung innerhalb dieser beiden Faktoren ändert den gesamten Verlauf der Kurve. Ferner ist nur ein gewisser Teil der Funktion wirklich benutzbar. Immerhin ist der Spielraum $^1/_{100}$ bis $^1/_2$ der angewandten $Ba\,Cr\,O_4$-Lösung hinreichend groß, um die Methode

[1]) Während bei dieser Methode die Ausschläge bei kleineren Mengen immer größer werden.

nicht zu unhandlich zu machen. Die Bestimmungsweise erfordert zumindest Neutralität der angewandten Lösungen; Alkaleszenz geringen Grades ist ohne meßbaren Einfluß selbst auf n/200 Lösungen. Kohlen- und Phosphorsäure stören die Bestimmung. Sie müssen entfernt werden: CO_2 durch vorheriges Erhitzen der angesäuerten Lösung und nachfolgende Neutralisation, P_2O_5 durch Fällung als Silbersalz mit dem Lp. von $3{,}8 \cdot 10^{-18}$ und Klärung der Flüssigkeit mit kolloidalem Eisenhydroxyd. Die Fehlergrenze beträgt bei reinen n/200 Lösungen etwa 2 bis 3 Proz. innerhalb 1 bis 5 ccm derselben Normalität.

Zusammenfassung.

Es wird eine maßanalytische Methode zur Bestimmung kleinster Mengen $SO_4^{=}$ mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes angegeben.

Das dabei angewandte Prinzip gestattet Ausblicke auf Verwendung in ähnlichen Fällen, z. B. bei P und CO_2.

Tabelle III.

Titrationswerte von n $Na_2S_2O_3$ für 1,0 bis 5,9 ccm n $SO_4^{=}$ bei Verwendung von 10 ccm n $BaCl_2$ und 10 ccm n K_2CrO_4.

	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
0,0	0,00	0,13	0,22	0,31	0,39	0,48	0,56	0,64	0,73	0,81
1,0	0,90	0,96	1,03	1,09	1,15	1,20	1,25	1,31	1,36	1,41
2,0	1,46	1,52	1,57	1,62	1,67	1,73	1,78	1,83	1,88	1,93
3,0	1,98	2,03	2,08	2,13	2,17	2,21	2,25	2,29	2,34	2,38
4,0	2,42	2,47	2,51	2,55	2,59	2,63	2,67	2,71	2,75	2,78
5,0	2,82	2,86	2,90	2,93	2,97	3,01	3,05	3,09	3,13	3,16

Entstehung eines die Reaktionen des Formaldehyds gebenden Körpers bei der sauren Gärung des Krautes.

Von

L. v. Liebermann.

(Aus dem hygienischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 24. November 1924.)

In jüngster Zeit ist es wiederholt vorgekommen, daß bei Händlern vorgefundenes Sauerkraut aus dem Grunde beanstandet wurde, weil die mit der Nahrungsmittelkontrolle betrauten Chemiker darin *Formaldehyd*, also ein unerlaubtes Konservierungsmittel, gefunden haben. Da die wegen Übertretung angeklagten Händler einen derartigen Zusatz entschieden geleugnet hatten, kam ich wiederholt in die Lage, als Referent des Sanitätsrates ein Obergutachten abzugeben. Zu diesem Zwecke angestellte Versuche haben nun ergeben, daß bei dem Gärungsprozeß, den das Kraut bei der Säuerung durchmacht und an dem vornehmlich Milchsäurebazillen und Saccharomycesarten beteiligt sind, ein Körper entsteht, der die charakteristischen Reaktionen des Formaldehyds gibt und sowohl direkt im filtrierten Saft des Sauerkrauts als *auch im Destillat* desselben nachzuweisen ist, am leichtesten nach der ursprünglich von *O. Hehner* angegebenen, später von *Fr. v. Fillinger* in meinem Laboratorium weiter vervollkommneten Methode: Unterschichten der Flüssigkeit, der etwas Peptonlösung zugesetzt wurde, mit konzentrierter Schwefelsäure, welche eine Spur Eisenchlorid enthält. wobei an der Berührungsstelle in sehr verdünnten Lösungen erst nach einigem Stehen ein violetter Ring entsteht[1]).

Es sei noch erwähnt, daß in unseren Versuchen die Säuerung des Krautes auf einfachste Weise, Einstampfen des Krautes unter Zusatz von Kochsalz und etwas Brot, geschah.

Die Versuche werden fortgesetzt und auch auf andere, einer ähnlichen spontanen Säuerung unterworfene Substanzen ausgedehnt.

---

[1]) Siehe Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **16**, 226, 1908.

Über die Bildung der Glucon- und Citronensäure in den Pilzkulturen auf Zucker.

Von

Wl. Butkewitsch.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium des staatlichen Timirjazeff-Forschungsinstituts und aus der landwirtschaftlichen Akademie Petrowsko-Rasumowskoje, Moskau.)

(Eingegangen am 3. November 1924.)

Bei den Versuchen mit Kulturen von *Aspergillus niger* und *Citromyces glaber* auf Rohrzucker mit Calciumcarbonat konnte ich stets die Bildung eines löslichen Calciumsalzes in denselben neben dem Citrat und Oxalat nachweisen[1]). Durch die vergleichende Analyse der Kulturen verschiedenen Alters ließ sich auch feststellen, daß die ein lösliches Calciumsalz bildende Säure sich nur intermediär anhäuft und durch den Pilz weiter verzehrt wird, während die Citronen- und Oxalsäure fortdauernd anwachsen. Von diesen Verhältnissen ausgehend, war ich geneigt anzunehmen, daß jene Säure eine Zwischenstufe bei der Bildung der Citronensäure darstellt. Die Frage nach dem Zusammenhang zwischen diesen Säuren konnte aber nach den vorliegenden Angaben nicht endgültig entschieden werden, da die Verzehrung der ein lösliches Calciumsalz liefernden Säure sowohl vom Zuwachs der Citronensäure als auch von dem der Oxalsäure begleitet wurde. Mithin konnte also auch die Bildung der letzteren bei der in Frage kommenden Umwandlung stattfinden.

Aus der vorläufigen Untersuchung der betreffenden Säure ergab sich, daß sie infolge gewisser Eigenschaften der Gluconsäure oder den Saccharinsäuren nahe steht, und ich sprach die Vermutung aus, daß hier vielleicht die Parasaccharinsäure vorliegt[2]), deren intermediäre

[1]) *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **136**, 224, 1923.

[2]) *Derselbe*, ebendaselbst **142**, 195, 1923.

Bildung bei der Citronensäuregärung von *Buchner* und *Wüstenfeld*[1]) als wahrscheinlich bezeichnet war.

Als aber *Molliard*[2]) über die von ihm entdeckte Bildung der Gluconsäure bei *Aspergillus niger* berichtet hatte, lag die Vermutung nahe, daß auch die von mir nachgewiesene Säure Gluconsäure ist. Diese Vermutung wurde durch weitere Untersuchungen bestätigt: Es ist mir gelungen, die Gluconsäure aus den Kulturen von *Aspergillus niger* auf Rohrzucker unter bestimmten Bedingungen in sehr großen Mengen abzuscheiden. Dabei wendete ich ein Verfahren an, das viel leichter als die von mir früher versuchte Fällung mit Bleiacetat[3]) zum Ziele führte. Es beruht auf der Unlöslichkeit des Calciumgluconats in Alkohol und besteht darin, daß dieses Salz aus der Kulturflüssigkeit direkt durch Alkohol niedergeschlagen wird[4]).

Kulturen von Aspergillus niger auf Rohrzucker mit Calciumcarbonat bei relativem Stickstoffmangel.

Versuch 1.

Bei diesem Versuch kam eine Nährlösung von folgender Zusammensetzung zur Anwendung:

Rohrzucker	20,00 Proz.	
NH_4NO_3	0,15 „	
Salze	0,10 „	($ZnSO_4$ = 0,01 Proz.)

Man stellte acht Kulturen auf, die je 150 ccm, gesamt 1200 ccm Nährlösung enthielten. Nach der Impfung wurden die Kulturen im Thermostaten bei einer Temperatur von 30° untergebracht. Nachdem sich am dritten Tage hinreichend starke Pilzdecken gebildet hatten, wurden die Kulturen aus dem Thermostaten herausgenommen und bei Zimmertemperatur von 20 bis 22° stehengelassen. Am sechsten Tage wurden allen Kulturen je 10 g durch Erhitzen sterilisierten Calciumcarbonats zugesetzt. Nach einigen Tagen ließ sich eine lebhafte Gas-

---

[1]) *Ed. Buchner* und *H. Wüstenfeld*, ebendaselbst **17**, 395, 1909.

[2]) *M. Molliard*, C. r. de l'acad. des sciences **174**, 881, 1922; **178**, 41, 1924.

[3]) *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **142**, 204, 1923.

[4]) Die in dieser Mitteilung beschriebenen Versuche sind schon im April dieses Jahres zum Abschluß gebracht gewesen, und im Anfang Mai zeigte ich meine Ergebnisse bezüglich der Gluconsäurebildung durch *Aspergillus niger* den Herren Kollegen *C. Neuberg* und *F. Ehrlich*, als sie in Moskau weilten und das Timirjazeff-Forschungsinstitut besuchten. Infolge gewisser Umstände hatte ich aber keine Möglichkeit, vor Ende Oktober meine Arbeit zum Drucken zu befördern. Inzwischen erschien eine Arbeit von *R. Falck* in den Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **57**, 920, in der er mitteilt, daß sich eine reichliche Bildung der Gluconsäure in den Kulturen von *Aspergillus niger* unter den Bedingungen nachweisen läßt, die denen meiner Versuche ziemlich nahe kommen.

entwicklung in der Kulturflüssigkeit an der Oberfläche des Calciumcarbonats beobachten, die beim Schütteln der Kulturen besonders stark wurde.

Am 14. Tage nach der Impfung wurden die Kulturen im *Koch*schen Sterilisator erhitzt, nach dem Abkühlen wurde die Flüssigkeit von den Niederschlägen und den Pilzdecken abfiltriert. Das Volumen der abfiltrierten Flüssigkeit betrug mit dem Waschwasser zusammen etwa 1200 ccm. Sie reduzierte ziemlich stark *Fehling*sche Lösung (beim Erhitzen), gab einen beträchtlichen Niederschlag mit Ammoniumoxalat und reagierte schwach sauer.

Bei der Titration mit Phenolphthalein als Indikator verbrauchten 10 ccm Flüssigkeit 5,9 ccm n/10 $Ba(OH)_2$.

Man setzte der Flüssigkeit eine zur Sättigung der freien Säure ausreichende Menge Calciumcarbonat zu und erhitzte sie im *Koch*schen Sterilisator. Nach dem Abkühlen filtrierte man den Niederschlag von der Flüssigkeit ab und fügte ihn den Kulturniederschlägen und Pilzdecken hinzu. Darauf wurde die vom Niederschlag abgetrennte Flüssigkeit durch Abdampfen im Vakuum bis zum halben Volumen eingeengt und ihr stufenweise beim Vermischen etwa 3 Vol. 90proz. Alkohols zugesetzt. Der dabei teils in amorphem, teils in kristallinischem Zustand abgeschiedene reichliche Niederschlag wurde nach einigen Tagen von der Flüssigkeit abgetrennt und wieder in heißem Wasser (300 bis 400 ccm) gelöst. Nach dem Abkühlen filtrierte man die Lösung von dem das Calciumcitrat enthaltenden, ungelöst gebliebenen Rückstand (etwa 4 g) ab, setzte dem Filtrat etwa 3 Vol. 90proz. Alkohols zu und ließ es stehen. Der sich abscheidende kristallinische Niederschlag wurde auf der Nutsche abgesaugt, mit Alkohol gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Auf diese Weise wurden beinahe 70 g Substanz erhalten, die noch eine geringfügige, mittels der Reaktion von *Denigès* nachweisbare Beimengung von Calciumcitrat enthielt. Von diesem ließ sich die Substanz durch Auflösen in 30proz. Alkohol unter Erwärmen und durch Auskristallisieren aus dieser Lösung unter Abkühlen leicht befreien. Die auf diesem Wege in Gestalt feiner nadelförmiger Kristalle erhaltene Substanz erwies sich allen ihren Eigenschaften nach mit dem Calciumsalz der d-Gluconsäure identisch, die aus Glucose durch Oxydation mit Brom dargestellt worden war.

Im Exsikkator, oder einfach an der Luft getrocknet, enthielt das Ca-Salz kein Kristallwasser und zeigte bei weiterem Trocknen unter 100 bis 110° nur einen ganz geringen Gewichtsverlust. Sein Gehalt an Ca-Oxyd betrug 13,0 Proz.[1]). Das Salz löst sich leicht in heißem Wasser; die unter Erwärmen gesättigte wässerige Lösung wies die Neigung auf, sich in übersättigtem Zustande nach dem Erkalten zu halten. Wurde eine derartige

[1]) Gluconsaures Calcium enthält nach Berechnung 13,02 Proz. CaO.

Lösung mit einer Spur gluconsauren Kalks geimpft, so trat bald Kristallisation des Salzes ein. Dabei bildeten sich eigentümliche, knollige Aggregate, die aus kleinen Nadeln zusammengesetzt waren. Das Salz war optisch aktiv, seine wässerige Lösung zeigte Rechtsdrehung. Eine 17,4 g Salz in 100 ccm enthaltende wässerige Lösung gab im 2-dm-Rohr bei 20° eine Winkelablenkung von + 2,2°. Daraus berechnet sich das spezifische Drehungsvermögen $[\alpha] = + 6{,}3°$[1]).

Die das Ca-Salz liefernde Säure bildete ein Phenylhydrazid, das aus wässeriger Lösung in farblosen Prismen kristallisierte. Aus Alkohol umkristallisiert und im Exsikkator getrocknet, schmolz es bei etwa 200° und zersetzte sich dabei unter Gasentwicklung. Die aus dem Ca-Salz mittels Oxalsäure abgeschiedene freie Säure war sirupartig und leicht löslich in Wasser und Alkohol. Nur bei langem Stehen der sirupartigen Säure im Exsikkator schieden sich Kristalle ab, die offenbar Lacton darstellten. Die freie Säure sowie ihre Salze reduzierten weder *Fehling*sche Lösung noch ammoniakalische Silberlösung.

Alle diese Eigenschaften sind der d-Gluconsäure eigentümlich.

Außer Gluconsäure enthielten die untersuchten Kulturen auch viel Oxal- und Citronensäure. Diese Säuren wurden nach dem üblichen Verfahren abgeschieden, das ich bei meinen früheren Versuchen angewendet hatte[2]).

Man extrahierte den von der Kulturflüssigkeit abgetrennten unlöslichen Rückstand zusammen mit den Pilzdecken, mit verdünnter Salzsäure und fällte die Citronensäure als Calciumcitrat aus der Lösung aus. Die Gesamtmenge des aus dem unlöslichen Kulturrückstand und aus der Kulturflüssigkeit (s. oben) erhaltenen Calciumcitrats betrug in wasserfreiem Zustande (ohne Kristallwasser) etwa 68 g und enthielt 33,46 Proz. Calciumoxyd[3]).

Der nach dem Extrahieren des Calciumcitrats übrig gebliebene Rückstand, d. h. die Pilzdecken und das Calciumoxalat, wog nach dem Trocknen bei 105° 46,5 g und enthielt 27,5 g, d. h. 60 Proz. Calciumoxalat[4]).

Der in den Kulturen unverbraucht gebliebene Zucker wurde nach *Bertrand* in der Kulturflüssigkeit bestimmt, nachdem der zur Fällung des Calciumgluconats zugesetzte Alkohol im Vakuum abdestilliert worden war.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in der weiter unten folgenden Tabelle zusammengestellt.

---

[1]) Nach *Bertrand* (C. r. **127**, 728, 1898) ist $(\alpha)_D^{20°}$ für gluconsaures Calcium + 6° 13′.

[2]) *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **131**, 327 und 338, 1922; **136**, 224, 1923; **142**, 195, 1923.

[3]) Nach Berechnung enthält Ca-Citrat, $Ca_3(C_6H_5O_7)_2$, 33,74 Proz. CaO.

[4]) In diesem Oxalat wurde 38,10 Proz. CaO gefunden. Nach Berechnung enthält Ca-Oxalat, $CaC_2O_4 \cdot H_2O$, 38,36 Proz. CaO.

Tabelle I.

Zweiwöchige Kulturen von Aspergillus niger auf 1200 ccm Nährlösung, die 20 Proz., d. h. 240 g Rohrzucker enthielt.

Pilzdeckengewicht (ohne Ca-Oxalat) . . .	19,0 g
Gluconsäure, $C_6H_{12}O_7$	63,7 g
Citronensäure, $C_6H_8O_7 . H_2O$	57,3 g
Oxalsäure, $C_2H_2O_4 . 2\,H_2O$	24,2 g
Unverbraucht gebliebener Zucker . etwa	25,0 g
Verbrauchter Zucker	215,0 g

Die Calciumsalze der in den Kulturen gefundenen Säuren enthalten folgende Mengen Calciumoxyd:

Ca-Oxyd in Ca-Citrat.	22,78 g
„ „ Ca-Gluconat	9,10 g
„ „ Ca-Oxalat	10,67 g
Gesamtmenge von CaO . . .	42,55 g

Diese Zahl kommt der Menge von Calciumoxyd, das als Calciumcarbonat den Kulturen zugesetzt und zur Sättigung der freien Säuren in der Kulturflüssigkeit verbraucht wurde, ziemlich nahe.

Ca-Oxyd in dem den Kulturen zugesetzten Ca-Carbonat (80 g)	44,80 g
Ca-Oxyd, das zur Sättigung der freien Säuren in der Kulturflüssigkeit gebraucht wurde	2,00 g
Gesamt . . .	46,80 g

Die Differenz zwischen den angegebenen Werten beträgt 4,25 g, d. h. etwa 10 Proz. Zieht man die unvermeidlichen Verluste bei der Abscheidung der Glucon- und Citronensäure in Betracht, so läßt sich annehmen, daß hier eine ganz gute Übereinstimmung vorliegt.

Die bei *Aspergillus niger* in Erscheinung tretende oxydative Umwandlung des Zuckers in Gluconsäure ist von hervorragendem Interesse, da eine derartige Umwandlung bisher nur bei gewissen Bakterien beobachtet wurde[1]). Es ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß *Aspergillus niger* in dieser Beziehung keine Ausnahme darstellt und daß die betreffende Umwandlung auch den anderen Pilzen eigentümlich ist, die dem *Aspergillus niger* der Art ihres Stoffwechsels nach nahe stehen[2]).

---

[1]) *Boutroux*, C. r. **91**, 236, 1880 (Micrococcus oblongus); *Brown*, Journ. of the chem. Society **69**, 432, 1886 (Bact. xylinum); *G. Bertrand*, C. r. **127**, 124 und 728, 1898 (la bactérie du sorbose). — Durch Sorbosebakterien lassen sich nach *Bertrand* außer Glucose auch andere Aldozuckerarten, wie Galaktose, Arabinose und Xylose, zu entsprechenden Säuren oxydieren.

[2]) Die Bildung der ein lösliches Ca-Salz liefernden Säure läßt sich stets auch in den Kulturen von *Citromyces glaber* auf Zucker nachweisen. Vgl. *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **136**, 224, 1923.

Nachdem nunmehr die Bildung der Gluconsäure neben der Citronensäure in den Pilzkulturen auf Zucker festgestellt worden war, entstand natürlich die Frage nach der etwaigen wechselseitigen Beziehung zwischen diesen Säuren.

In meiner vorigen Mitteilung[1]) führte ich einige Erwägungen an, die auf der Voraussetzung beruhten, daß der Übergang von Zucker in Citronensäure von einer inneren Aldolkondensation und von der intermediären Bildung einer zyklischen Verbindung mit fünfgliedrigem Ring begleitet wird. Was die Gluconsäure anbelangt, so kann diese Aldolkondensation hier nicht direkt zur Geltung kommen, da eine Aldehyd- oder Ketongruppe vorhanden sein muß, die bei der Gluconsäure fehlt. Es ließ sich aber vermuten, daß die Gluconsäure eine derartige Gruppe durch vorläufige Oxydation zu Glucuron- oder α-Oxygluconsäure erhalten kann.

Bekanntlich gibt es Bakterien, welche die Gluconsäure zu Oxygluconsäure oxydieren können[2]); doch bildet sich dabei nach *Boutroux*[3]) nicht α-, sondern δ-Oxygluconsäure, $CH_2 . OH . CO . (CHOH)_3 . COOH$, von der die Citronensäure nach dem oben besprochenen Schema ihrer Bildung nicht abgeleitet werden kann. Nach *Bertrand*[4]) oxydieren die Sorbosebakterien die polyvalenten Alkohole nur zu entsprechenden Ketosen, und der Übergang von der Alkohol- zur Ketongruppe kommt nur da zur Geltung, wo die Hydroxyle der benachbarten Kohlenstoffatome auf derselben Seite angeordnet sind, d. h. dort, wo die Gruppe

$$\begin{array}{cc} OH & OH \\ -\overset{\cdot}{C}- & \overset{\cdot}{C}- \\ H & H \end{array}$$

vorhanden ist.

Das Verhältnis von *Aspergillus niger* zu Gluconsäure wurde durch die Einwirkung der vorher aufgezogenen Pilzdecken auf die Lösung des Calciumgluconats geprüft, das aus den Kulturen dieses Pilzes beim vorigen Versuch 1 abgeschieden worden war.

Einwirkung der Pilzdecken von Aspergillus niger auf Gluconsäure.

Versuchsreihe 2.

Die Pilzdecken wurden im Thermostaten bei 32° auf der Nährlösung (je 30 ccm) aufgezogen, die 7 Proz. Rohrzucker, 0,2 Proz. NH_4NO_3 und 0,1 Proz. Salze (mit Zn) enthielt. Nachdem sich hinreichend

[1]) *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **145**, 442 (458), 1924.

[2]) *L. Boutroux*, C. r. **102**, 924, 1886.

[3]) *Derselbe*, ebendaselbst **127**, 1224, 1898.

[4]) *G. Bertrand*, ebendaselbst **122**, 900, 1896; **126**, 768, 842, 984, 1898; **129**, 341, 1899; **130**, 1330, 1472, 1900 (Oxydation von Glycerin, Erythrit. Arabit, Sorbit, Mannit, Volemit und Perseit zu entsprechenden Ketosen). Auch *Vincet* et *Delachanel*, ebendaselbst **125**, 716, 1897 (Oxydation von Mannit zu Lävulose durch dieselben Bakterien). Nach *Bertrand* können die Sorbosebakterien Glykol, Xylit und Dulcit weder zur Nahrung verbrauchen noch oxydieren.

starke, weiße Pilzdecken (Anfang der Conidienbildung) entwickelt hatten, wurden die Kulturflüssigkeiten von vier Kulturen abgegossen und die Pilzdecken mit sterilisiertem Wasser abgespült. Darauf wurde eine sterilisierte 12proz. Lösung von Calciumgluconat, zwei Kulturen, 1. und 2., je 25 ccm jeder Kultur, zugesetzt. Die zugesetzte Lösung enthielt außer Gluconat 0,05 Proz. Nährsalze mit 0,005 Proz. Zinksulfat. In zwei Kontrollversuchen, Kulturen 3 und 4, wurde nur diese Salzlösung ohne Gluconat angewendet. Zu den Kulturen 1 und 3 wurden außerdem noch je 2 g Calciumcarbonat zugesetzt. Die Lösungen mit den Pilzdecken wurden bei Zimmertemperatur von etwa 20° stehengelassen. In den Kulturen 1 und 2 schied sich das zugesetzte Calciumgluconat nach einigen Tagen zum Teil am Boden in Gestalt der ihm eigentümlichen knolligen Aggregate ab.

Am sechsten Tage wurde eine Probe der Flüssigkeit von der Kultur 2 steril entnommen. Die Flüssigkeit reagierte (auf Lackmus) neutral, reduzierte *Fehling*sche Lösung weder in der Kälte noch beim Erhitzen und gab keine Reaktion von *Denigès*. Darauf säuerte man die Flüssigkeit in der Kultur 2 etwas an, indem man ihr 5 ccm n Schwefelsäure steril zusetzte, und brachte alle Kulturen in den Thermostaten, wo sie noch 8 Tage bei einer Temperatur von etwa 30° stehen blieben. In den Kulturen mit Gluconat kam ein merkbarer Zuwachs der Pilzdecken während des Versuchs zur Geltung.

In den Kulturen mit Gluconat wurde außer der in beträchtlicher Menge unverbraucht gebliebenen Gluconsäure nur Oxalsäure nachgewiesen. Sie enthielten weder Citronensäure noch *Fehling*sche Lösung reduzierende Substanzen. Geringe Mengen von Oxalsäure waren auch in den Kontrollkulturen vorhanden.

Tabelle II.

	Kulturen mit Ca-Gluconat		Kontrollkulturen	
	1. mit $CaCO_3$	2. ohne $CaCO_3$ (mit H_2SO_4)[3]	3. mit $CaCO_3$	4. ohne $CaCO_3$
Pilzdeckengewicht . . . . g (ohne Ca-Oxalat)	0,438	0,655	0,329	0,288
Oxalsäure, $C_2O_4H_2 \cdot 2H_2O$ g	0,263	0,228	0,126	ein wenig

Citronensäure nicht vorhanden.
Reduktion mit *Fehling*scher Lösung nicht vorhanden.

Ähnliche Ergebnisse haben wir auch bei unserem früheren Versuch mit der Kultur von *Aspergillus niger* auf Gluconsäure erhalten, wo sich ebenfalls nur Oxal-, aber nicht Citronensäure nachweisen ließ[1]).

[1]) *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **142**, 195, (205) 1923. Versuchsreihe 6.

Die Gluconsäure scheint also keine Beziehung zur Bildung der Citronensäure aus Zucker zu haben, und der Zucker kann als Material zur Bildung der letzteren nur so lange dienen, als er seine Aldehyd- bzw. Ketongruppe intakt erhält. Das stimmt mit dem von uns vorausgesetzten Schema der Citronensäurebildung[1]) überein. Vom Standpunkte dieses Schemas wäre es von Interesse, das Verhältnis der die Citronensäure bildenden Pilze zu Glucuronsäure zu prüfen[2]). Von derselben ausgehend, kann man den Vorgang der Citronensäurebildung auf folgende Weise zum Ausdruck bringen:

```
          CHOH   CHOH                     CHOH   CHOH
         /          |                    /          |
HOOC—CHOH           |     →  HOOC—C.OH              |
                    |                    \          |
          COH    CHOH                     CHOH   CHOH
    Glucuronsäure

            CH₂  C<OH                          CH₂  C<OH
           /        OH                        /        O
 →  HOOC—C.OH           +O/−H₂O →  HOOC—C.OH
           \        OH                        \        O
            CH₂  C<OH                          CH₂  C<OH

                      CH₂  C<OH
                     /        O
            →  HOOC—C.OH
                     \        O
                      CH₂  C<OH
                Citronensäure.
```

Ganz analog den soeben beschriebenen Versuchen mit Gluconsäure wurden auch die Versuche mit Zucker angestellt, wobei die Kulturflüssigkeit nicht durch Gluconat-, sondern durch Rohrzuckerlösung ersetzt wurde.

Einwirkung der Pilzdecken von Aspergillus niger auf Rohrzucker in Anwesenheit von Calciumcarbonat und ohne dasselbe.

Versuchsreihe 3.

In dieser Versuchsreihe wurden sechs Kulturen gebraucht und je 25 ccm 10proz. Rohrzuckerlösung (mit Salzen wie oben) jeder Pilzdecke zugesetzt. Zu drei Kulturen wurden außerdem noch je 2 g Ca-Carbonat hinzugetan. Die Kulturen wurden teils bei Zimmertemperatur

---

[1]) *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **145**, 442 (458), 1924. Vgl. auch in dieser Mitteilung über die oxydative Umwandlung von Tetrahydrobenzol, die *Willstätter* und *Sonnenfeld* unter katalytischer Einwirkung von Osmium beobachtet haben.

[2]) Wir hoffen bald die Möglichkeit zu haben, diese Versuche mit Glucuronsäure anzustellen.

von etwa 20°, teils im Thermostaten bei 30° stehengelassen und von Zeit zu Zeit geschüttelt. In allen Kulturen ließ sich ein beträchtlicher Zuwachs der Pilzdecken während des Versuchs bemerken.

Bei der Analyse der Kulturen mit Ca-Carbonat wurden gelöstes Calcium und Zucker in der Flüssigkeit, sowie Citrat und Oxalat im Niederschlag und in der Pilzdecke nach den üblichen Verfahren[1]) bestimmt.

In den Kulturen ohne Ca-Carbonat wurden die Acidität, der Zucker in der Flüssigkeit und das beim Erhitzen derselben mit Ca-Carbonat in Lösung übergehende Calcium bestimmt. Der Gehalt an Citronensäure wurde nach der Acidität und nach dem gelösten Calcium, und zwar nach der Differenz berechnet. Die Citronensäure wurde in den Niederschlägen und Flüssigkeiten durch die Reaktion von *Denigès* nachgewiesen. Zucker bestimmte man nach *Bertrand*.

Als Kontrollkulturen dienten hier dieselben Kulturen wie im vorigen Versuch 2 (Kulturen 3 u. 4).

Die Ergebnisse der Analysen sind in der Tabelle III zusammengestellt.

Aus den von der Analyse restierenden Flüssigkeiten der Kulturen 7 und 9 wurde das Calciumgluconat durch Fällung mit Alkohol abgeschieden und der Gehalt dieses Gluconats an Ca-Oxyd bestimmt.

Tabelle III.

	Je 25 ccm 10 proz. Rohrzuckerlösung					
	6 Tage bei 20°		13 Tage bei 20°		6 Tage bei 20° u. 7 Tage bei 30°	
	5. mit $CaCO_3$	6. ohne $CaCO_3$	7. mit $CaCO_3$	8. ohne $CaCO_3$	9. mit $CaCO_3$	10. ohne $CaCO_3$
Pilzdeckengewicht (ohne Ca-Oxalat) . . . g	0,460	0,581	0,567	0,565	0,697	0,717
Acidität auf 10 ccm ursprüngl. Flüssigkeit n/10 $Ba(OH)_2$ . . . ccm	—	47,2	—	47,2	—	38,2
CaO in Flüssigkeit gelöst . . . g	0,162	0,049	0,120	0,040	0,117	0,034
Gluconsäure, $C_6H_{12}O_7$ . . . g	1,134	0,343	0,840	0,280	0,819	0,238
Citronensäure, $C_6H_8O_7 . H_2O$ . . . g	ein wenig	0,702	0,051	0,727	ein wenig	0,585
Oxalsäure, $C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$ . . . g	0,145	Spuren	0,474	0	0,562	0
Unverbraucht gebliebener Zucker . . . g	0,662	0,603	0,265	0,253	0,110	Spuren
Verbrauchter Zucker . . . g	1,838	1,897	2,235	2,247	2,390	2,500

[1]) *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **131**, 327, 1922; **136**, 224, 1923.

Gefunden 13,17 Proz. CaO; berechnet 13,02 Proz. CaO.

Wie aus den in der Tabelle III angeführten Ergebnissen ersichtlich ist, häuft sich auf Zucker mit Calciumcarbonat vorwiegend die Gluconsäure, ohne $CaCO_3$ die Citronensäure an[1]). Die Oxalsäure wurde in irgendwelcher beträchtlichen Menge nur in den Kulturen mit Ca-Carbonat nachgewiesen. Parallel ihrer Zunahme in den älteren Kulturen nahm die Gluconsäure ab.

Was die Rolle des Ca-Carbonats bei der relativen Anhäufung der Glucon- und Citronensäure in den Kulturen anbelangt, so scheint hier nicht das Calcium an und für sich, sondern die bei seiner Abwesenheit steigende Acidität maßgebend zu sein. Das ergibt sich daraus, daß eine sehr beträchtliche Anhäufung der Citronensäure auch in den Kulturen mit Ca-Carbonat zur Geltung kommen kann, wenn dasselbe bei der Abstumpfung der gebildeten Säuren erschöpft und die Kulturflüssigkeit sauer wird. Dieses Verhältnis läßt sich in der nächsten Versuchsreihe verfolgen.

Umwandlung des Zuckers in den Kulturen von Aspergillus niger ohne und mit Ca-Carbonat, unter relativem Mangel desselben.

Versuchsreihe 4.

Diese Versuchsreihe bestand aus vier Kulturen. Jede Kultur enthielt je 100 ccm Nährlösung von folgender Zusammensetzung:

Rohrzucker	25,0 Proz.
NH_4NO_3	0,2 „
Salze (mit Zn)	0,1 „

Die Kulturen wurden bei Zimmertemperatur von 17 bis 15° stehengelassen. Am zehnten Tage, nachdem sich starke Pilzdecken in den Kulturen entwickelt hatten, wurden je 10 g sterilisierter Kreide zwei Kulturen zugesetzt, wobei sich ein ziemlich starkes Aufbrausen beobachten ließ.

Nach 2 Wochen vom Beginn des Versuchs (von der Impfung) wurden zwei Kulturen, mit und ohne Kreide, und nach 6 Wochen auch die übrigen im *Koch*schen Sterilisator abgetötet und zur Analyse verwendet.

Die Analyse wurde ebenso wie bei den vorigen Versuchen (Versuchsreihe 3) ausgeführt. Die Citronensäure wurde aus allen Kulturen in Gestalt ihres Ca-Salzes abgeschieden und durch den Gehalt desselben an Ca-Oxyd sowie durch die Reaktion von *Denigès* identifiziert. Die

[1]) Dieses Verhältnis kommt sicherlich nur dann zum Vorschein, wenn die Bedingungen für die gegenseitige Einwirkung zwischen Ca-Carbonat und gebildeten Säuren günstig sind. In der vorliegenden Versuchsreihe war die Schicht der Kulturflüssigkeit von unbedeutender Höhe und die Kulturen wurden von Zeit zu Zeit geschüttelt.

Gluconsäure ließ sich als Ca-Gluconat durch Fällung mit Alkohol aus der Kulturflüssigkeit abscheiden. In der sechswöchigen Kultur mit Ca-Carbonat war letzteres ganz erschöpft, die Kulturflüssigkeit reagierte stark sauer und enthielt in Lösung viel Citronensäure.

Die Ergebnisse der Analysen sind in der Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV.

In jeder Kultur je 100 ccm Nährlösung mit 25 Proz. Rohrzucker.

	Kulturen ohne $CaCO_3$		Kulturen mit $CaCO_3$	
	Dauer der Kulturen			
	2 Wochen	6 Wochen	2 Wochen	6 Wochen
Pilzdeckengewicht . . . . g	1,002	1,693	1,337	1,638
Acidität auf 10 ccm ursprgl. Kulturflüssigkeit n/10 $Ba(OH)_2$ . . ccm	48,0	69,9	—	72,6
CaO in Kulturflüssigkeit gelöst g	—	—	1,280	0,738
CaO in Lösung nach Erhitzen d. Kulturflüssigkeit mit Überschuß von $CaCO_3$ . . . . . . g	0,880	0,398	—	0,251
Citronensäure $C_6H_8O_7 . H_2O$ in Niederschlag . g	—	—	1,894	3,752
Citronensäure $C_6H_8O_7 . H_2O$ in Lösung . . . g	1,160	3,899	—	6,311
Citronensäure $C_6H_8O_7 . H_2O$ gesamt . . . . . g	—	—	—	10,063
Gluconsäure, $C_6H_{12}O_7$ . . . . . g	6,160	2,784	8,960	1,754
Oxalsäure, $C_2H_2O_4 . 2H_2O$ . . . g	—	—	0,287	7,068
Reduktion d. *Fehling*schen Lösung	s. stark	stark	s. stark	s. schwach

Aus den Ergebnissen dieser Versuchsreihe läßt sich schließen, daß die Anhäufung der Citronensäure durch den mäßigen Zusatz von Calciumcarbonat nicht nur eingeschränkt, sondern gefördert wird, wenn die Acidität der Kulturflüssigkeit über eine gewisse Grenze ansteigt. Eine derartige Einwirkung von Calciumcarbonat wird wahrscheinlich bedingt durch die Verminderung des Citronensäureverbrauchs, der — wie von uns früher festgestellt wurde[1]) — durch das beträchtliche Ansteigen des Gehalts der Kulturflüssigkeit an freier Säure gefördert wird. Auf der anderen Seite handelt es sich hier vielleicht auch um die Beseitigung der verzögernden Einwirkung, welche die eine gewisse Grenze übersteigende Acidität auf die Umwandlung des Zuckers in Citronensäure ausüben kann.

Durch die oben besprochenen Versuche wurde festgestellt, daß der Grad der Anhäufung von Glucon- und Citronensäure von der Acidität der Kulturflüssigkeit abhängt, und zwar die Anhäufung der ersteren bei niedriger und die der letzteren bei höherer Acidität. Dies steht nicht im Widerspruch damit, daß die Citronensäure sich auch in den Kulturen mit einem Überschuß von Calciumcarbonat reichlich

[1]) *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **131**, 338, 1922.

anhäufen kann. Wenn man keine besonderen Maßregeln zur Vermischung der Flüssigkeit in solchen Kulturen ergriffen hat, so kann sich die freie Säure in der oberen Schicht der Kulturflüssigkeit in bedeutender Menge anhäufen. Das ergibt sich daraus, daß ein starkes Aufbrausen in der Kulturflüssigkeit bei ihrer Vermischung mit dem am Boden befindlichen Calciumcarbonat durch Aufschütteln erfolgt. Auch die Entwicklung von Kohlendioxyd aus dem am Boden liegenden Calciumcarbonat in den in Ruhe stehenden Kulturen weist ebenfalls auf die Anhäufung der freien Säure in der Kulturflüssigkeit hin.

Daß die Acidität für die Anhäufung der Glucon- und Citronensäure in den Pilzkulturen maßgebend ist, dafür sprechen auch die von *Molliard*[1]) mitgeteilten Ergebnisse, aus denen sich ergibt, daß sich die Gluconsäure anfangs und die Citronensäure erst später, nach Ansäuerung der Kulturflüssigkeit durch die erstere, in den Kulturen von *Aspergillus niger* auf Zucker anhäuft. Die vorwiegende Anhäufung der Gluconsäure in den jüngeren Pilzkulturen läßt sich auch an den Ergebnissen unserer oben beschriebenen Versuche verfolgen.

Alkoholbildung in den Kulturen von Aspergillus niger auf Zucker unter anaeroben Bedingungen.

Versuchsreihe 5.

In dieser Versuchsreihe verwendete man zwei Kulturen von *Aspergillus niger* mit und ohne Ca-Carbonat, die auf derselben Nährlösung und unter denselben Bedingungen wie die Kulturen der vorigen Versuchsreihe aufgestellt wurden. Nachdem sich die Pilzdecken hinreichend stark entwickelt hatten, sperrte man den Luftzutritt zu diesen Kulturen durch sterilisierte Gummistopfen ab, welche mit einem gebogenen Glasrohr versehen waren, dessen freies Ende in Quecksilber eingetaucht wurde. Nach 5 Wochen wurde das Pilzdeckengewicht und der Gehalt der Kulturflüssigkeit an Alkohol (nach Destillation pyknometrisch) bestimmt. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Tabelle V.

	Ohne $CaCO_3$	Mit $CaCO_3$
Pilzdeckengewicht . . . . g	0,712	0,588
Alkohol . . . . g	0,280	0,365
Acidität auf 10 ccm Kulturflüssigkeit n/10 $Ba(OH)_2$ . . . . ccm	25,5	—

Im Vergleich mit der aeroben oxydativen Umwandlung des Zuckers (Versuchsreihe 4) war die Bildung von Alkohol unter anaeroben Bedingungen ganz gering. Dasselbe Verhältnis kommt auch bei anderen

[1]) l. c.

Pilzen zum Vorschein, denen der aerobe oxydative Stoffwechsel eigentümlich ist. So konnten *Mazé* und *Perrier*[1]) nur sehr schwache Alkoholbildung auf Zucker unter Luftabsperrung bei den von ihnen untersuchten Citromyceten nachweisen, und bei der anaeroben Atmung von *Psalliota campestris* vermochte *Kostytschew*[2]) überhaupt keinen Alkohol zu finden. Auch *Penicillium glaucum* bildet, nach neuerdings veröffentlichten Untersuchungen von *Kostytschew* und *Afanassjewa*[3]), gar keinen Alkohol auf Zuckerlösung in Abwesenheit von Sauerstoff oder nur in ganz geringer Menge, während die Neigung zur oxydativen Verbrennung gerade bei diesem Pilz besonders stark ausgeprägt ist. Diese Umstände im Zusammenhang mit der bei gewissen Pilzen zur Geltung kommenden reichlichen Bildung der Glucon- und Citronensäure sprechen dafür, daß die oxydative Umwandlung des Zuckers, mindestens bei gewissen Pilzen, nicht in so obligatorischer Beziehung zur Alkoholgärung steht, wie man das überhaupt anzunehmen pflegt. In dieser Beziehung scheint der oxydative Stoffwechsel bei verschiedenen Organismen nicht gleichartig zu verlaufen. Wir werden bald die Gelegenheit haben, uns dieser Frage in einer besonderen Mitteilung zuzuwenden, in welcher die Ergebnisse unserer weiteren Untersuchungen über die die Chinasäure verzehrenden Organismen[4]) erörtert werden.

Zusammenfassung.

In den Kulturen von *Aspergillus niger* auf Zucker bildet sich — wie zuerst von *Molliard* festgestellt und von mir bestätigt worden ist — neben der Citronen- und Oxalsäure auch die Gluconsäure, die sich in diesen Kulturen unter gewissen Bedingungen in großen Mengen anhäuft. Die Gluconsäure läßt sich in Gestalt ihres Ca-Salzes aus der sie enthaltenden Kulturflüssigkeit durch Fällung mit Alkohol sehr leicht abscheiden.

Bei der Einwirkung von *Aspergillus niger* auf Gluconsäure oder ihr Ca-Salz ist es mir nicht gelungen, die Bildung der Citronensäure nachzuweisen; also scheint die Gluconsäure keine Zwischenstufe beim Übergang von Zucker in Citronensäure zu bilden. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist anzunehmen, daß die Gluconsäure durch den Pilz zu Oxalsäure oxydiert wird.

Für den Grad der Anhäufung von Glucon- und Citronensäure in den Kulturen des Pilzes auf Zucker ist die Acidität der Kulturflüssigkeit in gewissem Grade maßgebend. Bei niederer Acidität bildet sich vor-

---

[1]) *P. Mazé* et *A. Perrier*, Ann. de l'Inst. Pasteur **18**, 553, 1904.

[2]) *S. Kostytschew*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **25**, 188, 1907; **26a**, 167, 1908; Zeitschr. f. physiol. Chem. **65**, 350, 1910.

[3]) *S. Kostytschew* und *Afanassjewa*, Journ. d. Russ. bot. Ges. **6**, 11, 1921.

[4]) Vgl. *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **145**, 442, 1923.

wiegend die erste Säure, bei höherer die letztere. Im Zusammenhang damit steht die Erscheinung, daß in den Kulturen von *Aspergillus niger* auf Zucker zunächst die Gluconsäure und nur später die Citronensäure auftritt.

Auf der Rolle der Acidität beruht auch die Tatsache, daß sich in den Zuckerkulturen von *Aspergillus niger* mit Ca-Carbonat relativ viel Glucon- und wenig Citronensäure anhäuft, während ohne Ca-Carbonat, namentlich in älteren Kulturen, die umgekehrte Erscheinung zur Geltung kommt. Daß hier die Rolle der Acidität, aber nicht die des Calciums an und für sich maßgebend ist, ergibt sich daraus, daß das Ca-Carbonat die Anhäufung der Citronensäure nicht nur einschränkt, sondern fördert, wenn dasselbe in unzureichender Menge vorhanden ist, um die in der Kultur gebildeten Säuren vollständig zu neutralisieren.

Wenn die Citronensäure auch in den Kulturen mit überschüssigem Ca-Carbonat reichlich entsteht, so wird dies dadurch bedingt, daß die freien Säuren sich in der oberen Schicht der Kulturflüssigkeit trotz der Anwesenheit des Carbonats anhäufen.

Die Alkoholbildung in den Kulturen von Aspergillaceen auf Zucker ist unter anaeroben Bedingungen im Vergleich mit dem Umfang der oxydativen Umwandlung des Zuckers unter freiem Luftzutritt ganz unbedeutend. Diese Tatsache im Zusammenhang mit der reichlichen Bildung von Glucon- und Citronensäure bei denselben Pilzen spricht dafür, daß die oxydative Umwandlung des Zuckers, mindestens bei gewissen Pilzen, nicht in so obligatorischer Beziehung zur Alkoholgärung steht, wie das oftmals angenommen wurde.

Registriermethode zur gleichzeitigen Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs und der Kohlensäureabgabe[1]).

Von

P. Liebesny und H. Schwarz.

(Aus dem physiologischen Institut der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 3. November 1924.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Wie *A. Durig* (1) und andere gezeigt haben, und wie der eine von uns (2) bei Besprechung des *Krogh*schen Apparates bereits auseinandergesetzt hat, ist der O_2-Verbrauch unabhängig vom O_2-Partialdruck. Die Höhe des Sauerstoffverbrauchs des Nüchternen in der Ruhe kann unter bestimmten Grundbedingungen, die insbesondere durch die Diät des Vortages gegeben sind, ein exaktes Maß für den Grundumsatz bilden. Die ausgeatmete Kohlensäure kann jedoch nicht in gleicher Weise der bei der Verbrennung gebildeten Kohlensäure gleichgesetzt werden. Das venöse Blut enthält unter physiologischen Bedingungen rund 50 Vol.-Proz. CO_2. Von diesem Gehalt an CO_2 des venösen Blutes sind nur etwa 5 Vol.-Proz. im Gesamtstoffwechsel gebildet worden. Unter normalen Versuchsbedingungen bei normaler Atmung wird die im Stoffwechsel entstehende Kohlensäure restlos abgegeben. Der CO_2-Gehalt und die CO_2-Spannung des arteriellen Blutes bleiben im großen und ganzen unverändert. Bei kurzfristigen Respirationsversuchen, wie sie heute fast allgemein bei Untersuchung des Energiestoffwechsels angewendet werden, besteht jedoch die Gefahr, daß durch Überventilation ein Teil der dissoziablen Kohlensäure abgegeben wird oder bei unternormalem Atemvolumen ein Teil der produzierten Kohlensäure retiniert wird. *Krogh* (3) hat daher vorgeschlagen, den Grundumsatz aus dem O_2-Verbrauch allein zu bestimmen, und hat damit nicht nur eine Vereinfachung der Methode erreicht, sondern auch eine Fehlerquelle ausgeschaltet.

---

[1]) Nach einem auf der vierten Tagung der Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten gehaltenen Vortrag.

Die Bestimmung der Kohlensäure zwecks Feststellung des respiratorischen Quotienten ist jedoch bei einer Reihe von Stoffwechselfragen nicht zu umgehen, so insbesondere bei Grundumsatzbestimmungen der Diabetiker, bei welchen der respiratorische Quotient infolge der Acidose und infolge der Ungleichartigkeit, mit der die verschiedenen Nahrungsmittel in die Verbrennung eintreten, extreme Werte annehmen kann. Ferner ist die Bestimmung der CO_2 unerläßlich bei Untersuchung des Energiestoffwechsels bei der Arbeit und beim Studium mancher intermediärer Stoffwechselvorgänge und dergleichen.

Über den Wert der verschiedenen Methoden zur Bestimmung des respiratorischen Quotienten haben *Benedict* und seine Mitarbeiter gründliche und überaus exakte Untersuchungen angestellt. Die meisten der gut arbeitenden gasanalytischen Methoden konnten im klinischen Betrieb keine allgemeine Verwendung finden, da sie an die experimentelle Geschicklichkeit des Untersuchers größere Anforderungen stellen. Um somit die Bestimmung des respiratorischen Quotienten ohne Gasanalyse zu ermöglichen, ging unsere Bestrebung dahin, die Kohlensäurebildung während des Respirationsversuchs gewichtsanalytisch fortlaufend zu registrieren und dies gleichzeitig mit der Registrierung des Sauerstoffverbrauchs durchzuführen. Aus dem eingangs Angeführten geht hervor, daß bei exakten Bestimmungen der Kohlensäure außer der während des Versuchs gebildeten Kohlensäure auch die Atemmechanik einer verläßlichen Kontrolle unterzogen werden muß. Nur in diesem Falle kann die ausgeatmete Kohlensäure der gebildeten CO_2 gleichgesetzt werden. Die *gleichzeitige* Bestimmung von CO_2 und O_2 ist bei der Subtilität der Untersuchung des respiratorischen Quotienten eine unerläßliche Grundbedingung. Um dieses Prinzip der Gleichzeitigkeit der Registrierung des Sauerstoffverbrauchs und der Kohlensäureabgabe durchführen zu können, mußte eine Reihe physikalischer und technischer Details beachtet werden, insbesondere mußte die zur Verwendung gelangende Wage eine zureichende Empfindlichkeit haben.

Die von uns zu dem vorbenannten Zwecke ausgearbeitete Methode besteht (s. Abb. 1) aus einem ähnlich dem *Krogh*schen Apparat gebauten Spirometer *Sp*. Es unterscheidet sich von dem letzteren erstens dadurch, daß sich in unserem Spirometer kein Natronkalk befindet, eine zweite wesentliche Änderung besteht in der Konstruktion des Spirometerdeckels. Dieser muß durch ein senkrecht zur Schwingungsachse angebrachtes Laufgewicht bei unserer Versuchsanordnung derart äquilibriert werden, daß er in jeder Stellung sich im Gleichgewicht befindet. Die prinzipielle Wichtigkeit dieses konstruktiven Details soll weiter unten erörtert werden. Ein- und Ausatmung wird durch zwei Ventile reguliert, von denen das Inspirationsventil *J* das bekannte *Loven*sche

Ventil ist, das Exspirationsventil *V* ist ein Quecksilberventil, dessen nähere Beschreibung weiter unten erfolgt. Die Einatmung erfolgt auf dem Spirometer, das mit einem Luftsauerstoffgemisch gefüllt wird. Die Ausatmungsluft wird zunächst in einer Schwefelsäure- und Chlorcalciumvorlage T_1 und T_2 vom Wasserdampf befreit und geht danach durch das auf der Wage befindliche Absorptionsgefäß *Z*, welches etwa 1 kg Natronkalk enthält, und von hier zurück in das Spirometer. Das Absorptionsgefäß taucht mit zwei Glasglocken in zwei Glaswannen ein. Diese sind mit Wasser, das durch Schwefelsäure angesäuert ist, gefüllt und, den Boden der Glaswand durchbohrend, mündet je ein Glasrohr, das Niveau des Wassers überragend, in die Glasglocken.

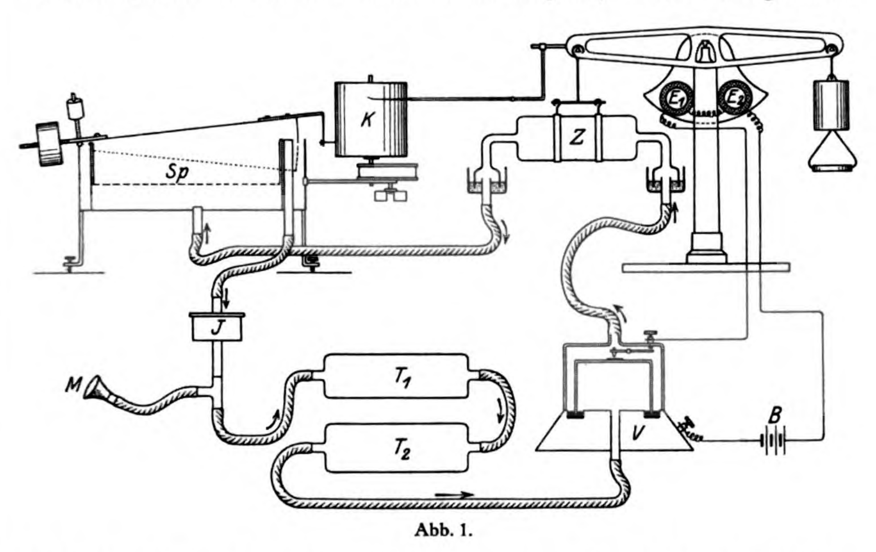


Abb. 1.

Auf diese Weise kann das Kohlensäureabsorptionsgefäß ohne direkte Schlauchverbindung an das Spirometer gasdicht angeschlossen werden. Die Empfindlichkeit der Registrierwage ist derartig, daß z. B. bei der von uns gewählten Schreibhebellänge der auf dem Kymographion *k* registrierte Ausschlag für 1 g 8,9 mm beträgt. 0,1 g können somit deutlich abgelesen, 0,05 g mit hinreichender Genauigkeit geschätzt werden. Die Gewichtsausschläge der Wage sind praktisch völlig proportional. Der Auftrieb der in das Wasser eintauchenden Glasglocken spielt bei der Wägung keine Rolle, da sich die während des Versuchs ergebenden Auftriebsunterschiede nicht geltend machen. Dies wurde auch durch die bereits erwähnte Proportionalität der Registrierung der Gewichtsunterschiede bestätigt. Um die durch den Exspirationsstoß entstehenden Schwingungen der Wage und damit des Registrierhebels zu verhüten, muß eine mit dem Exspirationsventil in Verbindung

stehende Dämpfungsvorrichtung angebracht werden. Dieselbe besteht darin, daß der Schwimmer des Quecksilberventils bei Beginn der Exspiration einen elektrischen Strom schließt, auf welchem Wege durch zwei Elektromagnete E_1 und E_2 die Wage automatisch arretiert wird. Die Genauigkeit der Wägung ist nur in dem Falle gewährleistet, wenn die bei der Atmung auftretenden Lageveränderungen des Spirometerdeckels die Gewichtsregistrierung nicht stören. Bei unseren Versuchen hat sich ergeben, daß bedeutende Störungen auftreten, wenn der Spirometerdeckel sich in einem anderen als im indifferenten Gleichgewicht befindet. Um die Einstellung des Spirometerdeckels im indifferenten Gleichgewicht genauestens durchführen zu können, mußte die oben angeführte Konstruktion des Deckels gewählt werden.

Mit der *Douglas-Haldane*schen Methode durchgeführte Vergleichsuntersuchungen der Kohlensäurebestimmung bei Patienten ergaben Differenzen bis zu 5 Proz., das ist also die optimale Genauigkeit, die bei nicht eingeübten Versuchspersonen zu erzielen sind.

Herr Kollege *Kupelwieser* hatte die Freundlichkeit, die physikalisch-mathematischen Berechnungen der Wageempfindlichkeit durchzuführen, wofür wir ihm an dieser Stelle bestens danken. *Kupelwieser* wird demnächst in der Zeitschrift für Instrumentenkunde darüber berichten.

Die Apparatur wird vom Universitätsmechaniker *Castagna* in Wien hergestellt.

Literatur.

1) *Durig*, Engelmanns Arch. 1903, Supplement. — 2) *Liebesny*, Med. Klinik **20**, 1922. — 3) *Krogh*, Wien. klin. Wochenschr. **18**, 1922.

Der Temperaturfaktor bei Kohlensäureassimilation und Atmung.

Von

Henrik Lundegårdh.

(Aus der ökologischen Station auf Hallands Väderö, Schweden.)

(Eingegangen am 6. November 1924.)

Mit 11 Abbildungen im Text.

I. Einleitung.

Aus den sehr zahlreichen Untersuchungen[1]) über die Wirkung der Temperatur auf die Geschwindigkeit physiologischer Vorgänge geht hervor, daß Q_{10} für ein mittleres Gebiet meistens Werte um 2 herum annimmt, während bei niedriger Temperatur viel höhere Werte auftreten. An der oberen Temperaturgrenze des Lebens sinken wiederum die Q_{10}-Werte rasch unter 1. Wir können also in den meisten bisher bekannten Fällen drei Gebiete der Temperaturkurve unterscheiden: 1. der rasch ansteigende Anfang, $Q_{10} > 3$, 2. der mittlere Teil, Q_{10} 2 bis 3, 3. der Endteil (Optimum bis Maximum), $Q_{10} < 1$.

Bei gewissen Vorgängen scheint Q_{10} im zweiten Teil nicht einmal den Wert 2 zu erreichen, z. B. nach den Versuchen *Matthaeis*[2]) und *Willstätters*[3]) bei der Kohlensäureassimilation. Ferner kann man häufig auch nicht im mittleren Temperaturgebiet von einer Konstanz des Q_{10} reden, es beginnt manchmal schon bedeutend vor dem Optimumpunkt abzunehmen. Diese Veränderungen von Q_{10} sind bisher fast gar nicht näher ausgewertet worden[4]). Es würde zu weit führen, das vorhandene Tatsachenmaterial im Detail zu prüfen. In der späteren Diskussion werden einige genauer untersuchte Fälle zum Vergleich herangezogen.

---

[1]) Siehe die Zusammenstellung in *Kanitz*, Temperatur und Lebensvorgänge. 1915.

[2]) *G. Matthaei*, Phil. Trans. Roy. Soc. London B. **197**, 47, 1905.

[3]) *Willstätter* und *Stoll*, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure 1918, S. 156.

[4]) Über die Auffassung *A. Kroghs* siehe in Abschnitt IV.

Ein besonderes Interesse hat das Optimum und der dritte Kurventeil erregt. Zwecks Erklärung der bei Enzymwirkungen erhaltenen Optimumkurve hatten schon *Tammann*[1]) und *Duclaux*[2]) das Superpositionsprinzip herangezogen. Sie fassen den abfallenden Kurventeil als die Resultierende der ursprünglichen steil aufsteigenden Temperaturkurve (die sie fortgesetzt denken) und einer zweiten steil abfallenden Kurve auf, die einen bei dem Optimum einsetzenden inaktivierenden oder zerstörenden Prozeß darstellt. Eine ähnliche Auflösung der Optimumkurve hat dann später *F. F. Blackman* für die Temperaturassimilationskurve vorgeschlagen[3]). In der Literatur findet man dies meistens unter dem Namen *Blackman*sche Theorie des Optimums, und wir werden im folgenden der Kürze halber diese Bezeichnung anwenden.

Bei unendlich kurzer Versuchsdauer würde nach *Blackman* eine stetig aufsteigende Kurve mit Q_{10} etwa 2 bis 3 entstehen, die zweite Periode würde also kein Ende haben. Bei einer Versuchsdauer von Stundenlänge, die z. B. *Matthaei* benutzt hat, auf deren Ergebnisse *Blackman* seine Theorie stützt, hat die „schädliche" Wirkung schon begonnen, die Enzyme sind teilweise zersetzt und man bekommt einen Wert, der um so niedriger ist, je länger das Objekt an der hohen Temperatur gehalten wurde.

Dieses stetige Sinken des Optimums und der überoptimalen Werte mit der Zeit ist durch spätere Untersuchungen von *Kujper*[4]), *Fernandes*[5]) u.a. über Atmung, von *Rutgers*[6]) über geotropische, von *de Vries*[7]) über phototropische Reaktionszeit, von *Talma*[8]) über Wachstum festgestellt worden.

Dagegen ist es diesen Forschern nicht gelungen, die *Blackman*sche Theorie in ihrer ursprünglichen Fassung zu bestätigen: *Blackman* meinte nämlich, daß es möglich sei, den abfallenden Ast (d. h. den zwischen Optimum und Maximum liegenden Teil) der Kurve restlos als die Resultierende zwischen der reinen Temperaturkurve mit Q_{10} 2 bis 3 und den „Zeitkurven", für die er einen logarithmischen Verlauf annimmt, zu erklären.

Kujper, der den Vorgang am eingehendsten verfolgt hat, bemerkt ausdrücklich, daß eine Extrapolierung im *Blackman*schen Sinne nicht möglich ist. Trotzdem konstruiert *Kujper* unbedenklich den idealen Verlauf der Kurve von 20° an unter Annahme von der Gültigkeit des Q_{10} für 10 bis 20° (= 2,8) auch für das Gebiet 20 bis 50° und gelangt so zu dem bekannten Diagramm, das in allen Lehr- und Handbüchern reproduziert wird. Leider wird dabei nur selten zur Genüge betont, daß es sich um eine hypothetische Konstruktion handelt.

Kujper hat mit halbstündigen Beobachtungsintervallen gearbeitet, d. h. die erste Atmungsbestimmung enthält die in den ersten 30 Minuten abgegebene Kohlensäure (hierzu kamen noch wenigstens 12 Minuten Vorerwärmung, bis die Temperatur konstant wurde). Noch viel längere Intervalle benutzte Miss *Matthaei*[9]). Sie fing erst nach 1 bis 2 Stunden Vor-

---

[1]) *G. Tammann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **16**, 317, 1892; **18**, 427, 1895.
[2]) *E. Duclaux*, Traité du microbiologie **2**, 193, 1899.
[3]) *F. F. Blackman*, Annals of Botany **19**, 281, 1905.
[4]) *J. Kujper*, Rec. des trav. bot. néerl. **7**, 131, 1910.
[5]) *D. S. Fernandes*, ebendaselbst **20**, 107, 1923.
[6]) *A. A. L. Rutgers*, ebendaselbst **9**, 1, 1910.
[7]) *M. S. de Vries*, Ber. d. deutsch. bot. Ges., Jahrg. 31, S. 233, 1913.
[8]) *E. G. C. Talma*, Rec. des trav. bot. néerl. **15**, 366, 1918.
[9]) *Gabrielle Matthaei*, a. a. O. 1905.

erwärmung an und arbeitete mit Intervallen von 1 bis 2 Stunden Dauer. Die Methodik ließ wahrscheinlich nicht feinere Beobachtungen zu, es unterliegt aber keinem Zweifel, daß, wenn mit Intervallen von 2 bis 5 Minuten und sehr kurzer Vorerwärmung gearbeitet wird, das Problem mit viel größerer Exaktheit angegriffen werden könnte. Kann man nicht unter ½ bis 2 Stunden Beobachtungsdauer gehen, so soll man überhaupt nicht behaupten, daß das Optimum eine Zeitfunktion wäre. Es ließe sich doch von vornherein sehr wohl der Fall denken, daß ein absolutes, „zeitloses", Optimum existiert, daß aber nach einiger Zeit sekundäre Störungen (= *Blackmans* Enzymzersetzung) eintreten. Bei der Assimilation kann auch ein langsam erfolgender Spaltöffnungsverschluß eine „Zeitkurve" vortäuschen.

Bei der Atmung der Keimlinge, die zuletzt von *Fernandes* studiert wurde, sind die Vorgänge bedeutend komplizierter, als von früheren Forschern angenommen wurde. *Fernandes* nimmt eine Änderung auch *der Synthese* der Atmungsenzyme durch die Temperatur an, wodurch wenigstens drei Komponenten der Kurve gegeben wären. Tatsächlich verlaufen die Zeitkurven der Keimlingsatmung nur bei niedriger Temperatur (0 bis 10°) annähernd konstant. Bei 20 bis 30° findet ein Ansteigen statt, bei 35 bis 50° fallen die Kurven ab, aber selten regelmäßig. Auch bei der geotropischen und phototropischen Präsentationszeit wurde bei 30° eine gewisse Beschleunigung mit der Zeit gefunden (*Rutgers, M. S. de Vries*). Bei Keimlingen spielt auch die große Periode des Wachstums stark mit hinein, ferner ist immer mit Störungen durch Bakterien zu rechnen (*Fernandes*).

Eine weitere Frage, für die ebenfalls *Blackman* anregende Gesichtspunkte geltend gemacht hat, betrifft das Zusammenwirken des Temperaturfaktors und des Lichtfaktors bei der Assimilation. Die Versuchsergebnisse *Matthaeis* wurden von *Blackman* im Sinne des Minimumgesetzes gedeutet. Miss *Matthaei* hatte ihre Temperaturversuche bei drei Lichtintensitäten ausgeführt, die sich zueinander wie 1 : 2 : 4 verhielten. Sie fand hierbei, daß alle Kurven anfangs (bis 0 oder 10°) steigen; während aber bei der Lichtintensität 4 der Anstieg noch bei 25° anhält, so erreicht bei Licht 1 die Assimilation schon bei 10° ihr Höchstmaß, und die Assimilationsintensität bleibt dann konstant bis 25°. Nach *Blackman* wirke das Licht als absolut „begrenzender Faktor".

Eine nähere Betrachtung der Versuchsergebnisse *Matthaeis* zeigt nun, daß sie zwar eine verschiedene Höhenlage der drei Temperaturkurven beweisen, aber daß sie ungenügend sind, um die behauptete absolut begrenzende Wirkung des Lichts aufzuzeigen. Die betreffenden Versuche sind in Tabelle VI bei *Matthaei* zu finden. Aus der Tabelle geht hervor, daß mit sehr großen Temperaturintervallen gearbeitet wurde. Es wurden nur vier Temperaturstufen gewählt: 0,4, 8,8 bis 9,2, 11,4 und 24,8 bis 25,2°. Der Sprung von 11 bis 25°, also 14°, ist doch zu groß, als daß es berechtigt wäre, den zwischenliegenden Kurventeil zu interpolieren. Miss *Matthaei* verbindet aber unbedenklich die extremen Punkte (s. Abb. 3, a. a. O., S. 70) und behauptet damit bewiesen zu haben, daß bei Licht 1 und 2 die Assimilation zwischen 11 und 25° keine Schwankung erfährt. Es wäre doch ganz gut möglich und ist nach meinen Versuchen sogar wahrscheinlich, daß etwa bei 20° ein Optimum vorhanden wäre, und daß also der Punkt 11° auf einem aufsteigenden Ast, Punkt 25° auf einem abfallenden Ast einer Optimumkurve läge.

Aus den Versuchen von *Matthaei* sowie späteren Beobachtungen von *Willstätter* und *O. Warburg* können keine bestimmten Schlüsse gezogen werden. Diese sämtlichen Forscher haben mit sehr hohen, in der Natur praktisch niemals vorkommenden Kohlensäurekonzentrationen gearbeitet (bei *Matthaei* 0,8 bis 2,8 Proz., bei *Willstätter* 5 Proz., bei *Warburg* etwa 4 Proz.).

Aus dieser Übersicht erhellt, daß man bisher überhaupt nichts von dem Aussehen der Temperaturkurve der Assimilation bei natürlichen Licht- und CO_2-Bedingungen wußte. Das Zusammenwirken der drei Faktoren ist sehr unvollständig studiert.

Untersuchungen über die Wirkung des Temperaturfaktors wurden in meinem Laboratorium von *Nils Johansson* aufgenommen, wobei sich eine auffallend niedrige Lage des Optimums herausstellte (Material: *Eupteris*- und *Dryopteris*arten). *Nils Johansson* wird in einer besonderen Arbeit seine Ergebnisse, die hauptsächlich andere Zwecke verfolgten, schildern. In Anbetracht der hohen Bedeutung der Frage sowohl für die Theorie der Assimilation wie für die Ökologie habe ich unter Anwendung spezieller Methoden eigene Versuche ausgeführt, über die nunmehr berichtet werden soll.

II. Methodik der Assimilationsbestimmung.

Die Assimilationsintensität wurde wie früher durch Analyse des CO_2-Gehalts der Luft vor und nach dem Versuch bestimmt.

A. *Das Untersuchungsmaterial* waren Blätter von *Solanum tuberosum* aus dem Gemüsegarten der Station, Blätter von *Solanum lycopersicum* und *Cucumis sativus* aus dem Gewächshause der Station, also Nutzpflanzen, die verschiedene Klimatypen repräsentieren. Auf die Behandlung des Versuchsmaterials wurde ganz besondere Sorgfalt verwendet, und zwar aus zwei Gründen.

Erstens ist durch zahlreiche Erfahrungen verschiedener Forscher bekannt, daß die Assimilations- und Atmungsintensität mit der Menge der im Blatte vorhandenen Assimilate wechselt. Aus diesem Grunde wurden kurze Zweige der Pflanzen in den frühen Morgenstunden gepflückt, sogleich in einen geräumigen Glasrezipienten, der am Boden etwas Wasser enthielt, gesteckt und schnell in das Laboratorium getragen. Von diesem Material wurden im Laufe des Tages die einzelnen Blätter für die Versuche abgeschnitten. Die Glasbehälter standen immer in hellem, diffusen Licht und waren durch aufgelegte, nicht fest schließende Deckel aus Glas verschlossen. Die Pflanzenteile erhalten also fast nur Atmungskohlensäure und können ihr Kohlehydratkapital nicht nennenswert vermehren. Sie zeigen bei dieser Vorbehandlung eine gleichmäßige Assimilation und Atmung. Die starken Schwankungen

in den ersten 24 Stunden nach dem Abschneiden, die *Matthaei* und *Blackman* erwähnen, habe ich nicht gefunden[1]).

Zweitens ist genau darauf zu achten, daß die Stomata voll geöffnet sind. Wegen der durch das Licht bedingten Tagesperiode der Spaltöffnungsbewegungen kann man bei Kartoffeln niemals später als 3 bis 4 Uhr nachmittags (im August bis Oktober) arbeiten. Die Tomatenblätter verschließen ihre Stomata erst spät abends. Alle Pflanzen öffnen die Stomata sehr früh morgens (6 bis 8 Uhr vormittags). Schwieriger zu beherrschen bei Freilandpflanzen ist die Luftfeuchtigkeit. Wenn man aber immer die Blätter spätestens um 8 bis 9 Uhr vormittags holt, so sind die Stomata fast ausnahmslos voll geöffnet und halten sich in diesem Zustande in der feuchtgesättigten Rezipientenluft. Die Gewächshauspflanzen stehen ja immer in feuchter Luft, und sie hatten auch immer voll geöffnete Stomata. Die Tomatenblätter zeigten auch betreffs Feuchtigkeitsschwankungen große Resistenz. Man begegnet bei der Tomate überhaupt sehr selten verschlossenen Stomata, weshalb diese Pflanze zu Assimilationsversuchen sehr empfohlen werden kann. Die Blätter wurden natürlich immer von denselben Individuen und etwa auf derselben Höhe genommen, dieses namentlich, um Unterschiede im Chlorophyllgehalt zu vermeiden.

Der Öffnungszustand der Stomata wurde nach jedem Versuch mittels Infiltration mit Xylol oder mit Wasser geschätzt. Im letzten Falle wurde das Blatt in den von mir früher (Der Kreislauf der Kohlensäure in der Natur, 1924, S. 95) beschriebenen Apparat eingeschlossen und die Infiltration nach einer Druckminderung von ½ Atm. vorgenommen. In den Tabellen ist die Öffnungsarea schätzungsweise angegeben. 1 : 1 bedeutet volle Öffnung, 1 : 10 bedeutet, daß mit der Wassermethode etwa 1 : 10 der Blattfläche infiltriert war, usw.

Bei dieser sorgfältigen Behandlung des Materials und dauernden Kontrolle der Stomata reagierten die Blätter äußerst gleichförmig und die Variation ist kaum größer, als wenn mit Algen oder Moosen gearbeitet wird.

B. Als *Untersuchungsgefäß* nahm ich eine planparallele Spiegelglasküvette von inneren Dimensionen 1 × 5 × 10 cm. Das Blatt wird in diesem flachen Raume praktisch plan gehalten. Der kurzgeschnittene Blattstiel tauchte in ein paar Tropfen Wasser am Boden des Gefäßes. Bei der kurzen Versuchszeit (vgl. unten) wurden auf diese Weise Transspirationsverluste vermieden.

Die Küvette war mit einem durch eine starke Feder festgeklemmten Deckel aus Kautschuk verschlossen, durch den Zu- und Ableitungs-

[1]) Siehe hierzu auch die gleichen Erfahrungen *Willstätters* und *Stolls*, a. a. O. 1918, S. 73.

röhren von 1½ mm lichter Weite gingen (s. Abb. 1). Das Untersuchungsgefäß wurde in eine größere Spiegelglasküvette (Dimensionen etwa 6 × 10 × 20 cm) aufgehängt, die als Wasserbad diente. Für die Versuche mit strömender Luft war in dem Bade eine Glasrohrspirale eingelegt, durch welche die einströmende Luft temperiert wurde. Durch eine besondere Vorrichtung wurde das Wasser in ständiger Bewegung gehalten. Irgend einen besonderen Temperaturregulator habe ich nicht benutzt, weil die Versuchszeit für die kurzen Versuche nur 2,5 bis 5 Minuten, für die längeren nur 6 bis 12 Minuten betrug. Bei den niedrigen Temperaturen wurde durch Hineinwerfen von Eisstücken,

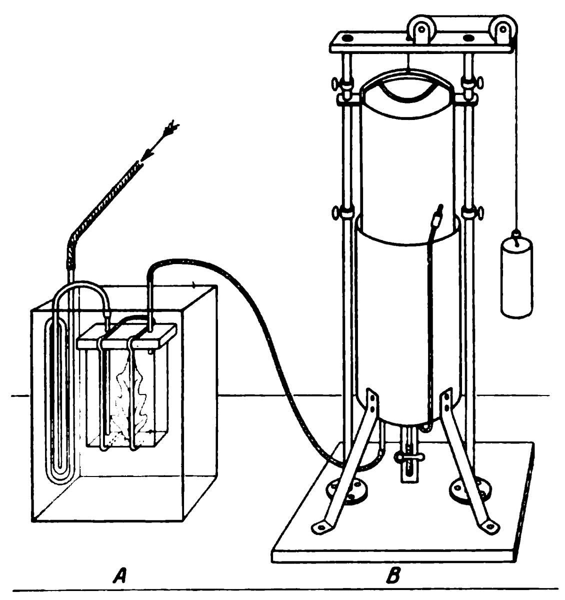


Abb. 1. Versuchsanordnung bei normalem CO_2-Gehalt.

bei hohen Temperaturen durch Zufügen warmen Wassers die nötige Konstanz erhalten. Wie aus den Tabellen erhellt, betrugen die Schwankungen meistens einige Zehntel, in extremen Fällen 1 bis 2°. In Anbetracht dessen, daß eine völlige Übereinstimmung in der Temperatur des Blattes und des Wasserbades unerreichbar ist, erscheinen mir diese Schwankungen belanglos.

Über die Innentemperatur des Blattes im Verhältnis zur umgebenden Luft bestehen verschiedene Meinungen. Namentlich bei direkter Insolation in geschlossenem Gefäße soll nach *Blackman* und *Matthaei* das Blatt sich um mehrere Grade über die Umgebung erwärmen. *Willstätter* fand dagegen — ebenfalls durch thermoelektrische Messungen —, daß bei Bestrahlung mit 50000 Lux (gleich etwa vollem Sonnen- und

Himmelslicht) durch das Wasserbad hindurch die Blattemperatur nur 2 bis 3° höher als die Badtemperatur stand. Nach den Untersuchungen von *E. C. Miller* und *A. R. Saunders*[1]) erwärmen sich in voller Sonne turgeszente Blätter meistens nur um wenige zehntel Grad. Bei ruhiger, feuchtgesättigter Luft ist natürlich die Gefahr vor Erwärmung am größten. Um ein eigenes Urteil hierüber zu fällen, habe ich in Gemeinschaft mit *Nils Johansson* eine Reihe Temperaturbestimmungen in dem geschlossenen Treibhaus der Station ausgeführt. Das Thermoelement war aus Nickel und Konstantan zusammengesetzt und die eine Lötstelle in eine zugespitzte Silberröhre von etwa 0,5 mm Durchmesser eingeschlossen. Dies, um die Lötstelle vor der direkten Berührung mit dem leitfähigen Zellsaft zu schützen. Die Thermonadel wurde von unten her in das Blatt eingesteckt. Die Ablesung erfolgte an einem Spiegelgalvanometer mit Fernrohr, das in dem angrenzenden zweiten Laboratorium der Station aufgestellt war. Ein Ausschlag des Galvanometers von 50 mm entsprach 1°.

In Tabelle I ist eine Beobachtungsreihe aufgeführt.

Tabelle I.

Versuchspflanze Gurken.

Zeit	Temperatur			Bestrahlung
	der Luft °C	des Blattes °C	Differenz °C	
12a bis 1p August 1924	34,8	32,0	— 2,8	Sonne in Wolken
	35,2	32,92	— 2,28	” ” ”
	35,8	36,8	+ 1,0	Sonnenschein
	36,1	37,4	+ 1,3	”
	36,5	38,9	+ 2,4	”
	35,0	36,15	+ 1,15	”

Sogar bei ruhiger Luft erwärmen sich also die Blätter sehr wenig in der Sonne, was selbstverständlich auf der starken Transpiration beruht, die im Schatten eine entsprechende Unterkühlung mitbringt. Es liegt also sicher keine Gefahr vor, daß die in der Küvette hinter einer 2 cm kühlenden Wasserschicht eingeschlossenen Blätter (Abb. 1, *A*) sich mehr als *höchstens* 1 bis 2° über die Wassertemperatur erwärmen, und dieser Fehler ist dann ein annähernd konstanter. Daß die Blätter stark transpirieren, zeigt der Beschlag, der immer, namentlich auf der *hinteren* Seite der Küvette entsteht. In den Versuchen mit strömender Luft ist natürlich die Temperaturerhöhung noch unscheinbarer. Nach dem Ausfall der vergleichenden Temperaturbestimmungen habe ich keinen Grund gesehen, die sehr zeitraubende und wegen der diffizilen Methodik immer etwas unsichere Temperaturkontrolle für jedes unter-

[1]) Journ. agric. science 1923.

suchte Blatt durchzuführen. Aus den thermoelektrischen Bestimmungen ging auch hervor, daß das Blatt sich sehr schnell an Änderungen der Lufttemperatur akkomodiert. Praktisch bringt dies den großen Vorteil, daß die Vorerwärmung auf wenige Minuten herabgedrückt werden kann. Kontrollversuche lehrten, daß nach 4 bis 5 Minuten Vorerwärmung bzw. Abkühlung das Blatt schon die Temperatur des Bades angenommen hat.

C. Als *Lichtquelle* diente in erster Linie das direkte Sonnenlicht in einem Südfenster des Laboratoriums. Die Küvette wurde dicht an der Fensterscheibe aufgestellt. Kleinere Schwankungen der Bestrahlung blieben bei diesem maximalen Licht ohne Einfluß auf die Assimilation. Bei der kurzen Versuchszeit konnte das Sonnenlicht der meistens klaren Frühherbsttage befriedigend ausgenutzt werden. Vom ökologischen Standpunkt ist selbstverständlich das natürliche Licht den künstlichen Lichtquellen vorzuziehen.

Für schwächere Intensitäten ($^1/_{12}$ bis $^1/_{25}$ Licht) wurde jedoch der Bequemlichkeit halber Acetylen, und zwar in Form des sehr reinen sogenannten Dissousgases der schwedischen Aga-Gesellschaft benutzt. Das komprimierte, in Aceton gelöste Gas wird durch ein Ventilsystem auf einen niedrigen konstanten Druck reduziert. Hinter dem Flachbrenner stand ein großer versilberter Hohlspiegel, der ein gleichmäßiges Licht auf das Objekt warf. Der Vergleich des Dissougaslichtes mit dem maximalen Sonnen- und Tageslicht ($= ^1/_1$ Licht) wurde auf photographischem Wege in Gelb und Blau ausgeführt.

D. *Der Kohlensäurefaktor* wurde in zwei Intensitäten variiert. Teils ein Gehalt von 1,22 Proz., in welchem Falle eine auf 100 Atm. in einen großen Stahlzylinder komprimierte Luftmischung benutzt wurde. Teils der Normalgehalt, etwa 0,03 Proz., in welchem Falle die freie, vom Meere her wehende Luft durch eine ausragende Glasröhre aufgesaugt wurde. Der Gehalt wurde mehrmals täglich durch Analysen in meinem Becherapparat[1]) kontrolliert. Von Tag zu Tag wechselt der Gehalt ziemlich stark[2]), hält sich aber am Meere im Laufe der hellen Stunden ziemlich konstant.

Für die Analysenmethodik war die unbedingte Forderung einer sehr weit getriebenen Exaktheit zu stellen. Nur auf diese Weise war es möglich, die Versuchszeit auf wenige Minuten herunterzubringen, auch beim Normalgehalt der Luft.

a) Versuche bei hohem CO_2-Gehalt. Bei dem hohen CO_2-Gehalt wurde volumetrisch analysiert, und zwar in einem neuen, von mir

[1]) *H. Lundegårdh*, diese Zeitschr. **131**, 109, 1922.
[2]) Derselbe, Der Kreislauf der Kohlensäure usw. **1924**, Kapitel 1.

konstruierten Apparat, dem hier eine kurze Beschreibung gewidmet wird (s. Abb. 2).

Das Prinzip dieses Apparates unterscheidet sich von dem bisher üblichen dadurch, daß die Luftprobe nicht in den Kaliapparat übergeführt wird, sondern umgekehrt der Kaliapparat in den Luftraum hineingeschoben wird.

Die Hauptteile des Apparates sind ein Zylinderraum A mit Pistonvorrichtung P, in den die Luftprobe eingesaugt wird, und ein Kaliapparat besonderer Konstruktion. Letzterer besteht aus einem mit dem Zylinder A durch Schliff verbundenen, mit 30 Proz. Kalilauge gefüllten Behälter B, der mit einer zentralen Röhre N versehen ist. Durch die Röhre läuft eine Metallstange D, die unten mit einer Handhabe, oben mit einer runden Scheibe M versehen ist, die als Deckel auf dem feingeschliffenen Rande des Behälters B ruht. Am unteren Ende der Röhre N ist eine Metallkapsel G mit Packung aus eingefettetem Kautschuk angebracht, so daß bei der Bewegung der Stange D keine Luft hindurchschlüpft. Die Scheibe M trägt an der unteren Seite Haken, an den mittels Platindraht ein Bündel dünner Glasröhren aufgehängt ist. Wird die Handhabe D durch Auflegen der Feder F abwärts gezogen, so ist der Kaliapparat B von dem Zylinderraum A abgeschlossen. Wird die Feder F ausgeklappt und die Handhabe D in die Höhe geführt, so bewegt sich der Deckel M mit den anhängenden, kalifeuchten Röhren in den Zylinderraum A hinein und die Kohlensäure wird absorbiert.

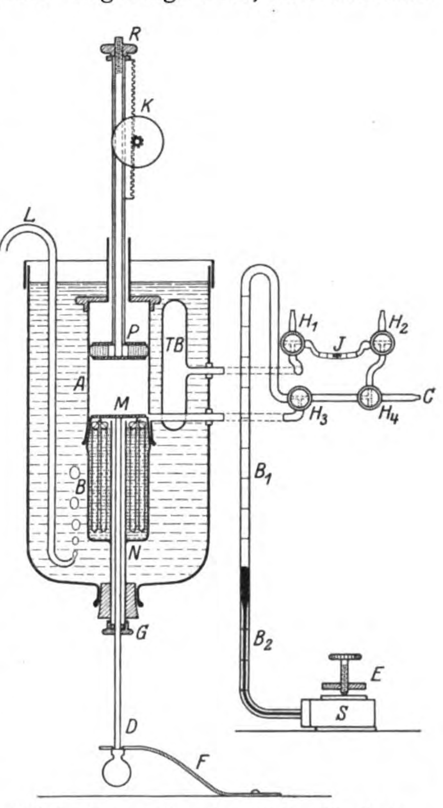


Abb. 2. Apparat für volumetrische CO_2-Analyse.

Das Abmessen des Luftvolumens vor und nach der Absorption wird durch eine kleine graduierte Bürette $B_1 - B_2$ in Verbindung mit einem Index I aus Petroleum ausgeführt. Die Bürette wird durch Umstellen der Hähne H_3, H_4 und H_2 in Verbindung mit dem Zylinder-

raum A und mit dem Index I gebracht. Auf der anderen Seite steht der Index in Verbindung mit einem Thermobarometer TB, das sich in dem den ganzen Apparat umhüllenden Wassermantel befindet. Die Meßbürette wird unten durch eine dickwandige, mit Quecksilber gefüllte Kautschukblase S abgeschlossen. Vermittelst der Klemmschraube E wird das Niveau des Quecksilbers in der Bürette reguliert. Die Bürette hat einen oberen weiteren (B_1) und einen unteren engeren (B_2) Teil. In dem von mir benutzten Apparat entsprach bei einem Probevolumen von etwa 30 ccm (Pistonhöhe 40 mm) ein Teilstrich der weiteren Röhre 0,03 Proz., ein Teilstrich der engeren Röhre 0,0025 Proz. CO_2. Die verschiedenen Teile sind in einem Schränkchen aus Eichenholz befestigt.

Der Gang der Analyse ist wie folgt. Die Hähne werden so umgestellt, daß der Zylinderraum A in die Ausfuhr C mündet, die mittels eines englumigen Schlauches mit dem Untersuchungsgefäß (Abb. 1, A) verbunden wird. Darauf wird mittels des Zahntriebes K das Piston langsam in die Höhe geschoben. Die aus dem Untersuchungsgefäß eingesaugte Luft wird durch Wasser ersetzt[1]). Nachdem eine Probe von genügender Größe eingesaugt ist (es wurde bei diesen Versuchen immer 40 mm Pistonhöhe = etwa 30 ccm Luft genommen), werden die Hähne wieder umgestellt, der Index auf Null eingestellt und man liest das Quecksilberniveau in der Meßröhre ab. Dann wird der Kaliapparat in die Höhe geschoben. Nach einigen Sekunden wird der Kaliapparat wieder in die Anfangslage gebracht, man stellt von neuem den Index ein und liest den Quecksilberstand ab. Aus der Differenz der ersten und zweiten Ablesung wird der CO_2-Gehalt berechnet. Während der ganzen Operation wird ein kräftiger Luftstrom durch das Mantelwasser getrieben (Abb. 2, L). Der Apparat soll in einem Zimmer von möglichst konstanter Temperatur stehen.

Dieser hier kurz beschriebene Apparat hat gewisse Vorzüge. Erstens ist das unbequeme Quecksilber älterer Apparate durch eine Pistonvorrichtung ersetzt, was auch eine weitgehende Variation des Probevolumens ermöglicht. Zweitens wird die Meßröhre niemals beschmutzt, was bei den gewöhnlichen Gasbüretten bekanntlich allzu leicht eintritt. Drittens kann man die Absorption der Kohlensäure direkt am Index ablesen, braucht also diesen nicht während der Absorption auszuschalten, was bei den bisherigen Apparaten — wenn der CO_2-Gehalt groß ist — häufig darin resultiert, daß der Index beim Wiedereinschalten zerreißt.

Die Genauigkeit der CO_2-Bestimmung ist bei sorgfältiger Arbeit genügend groß. Zahlreiche Serienbestimmungen der „freien“ Luft

[1]) Zu diesem Zweck wird die linke Zuleitungsröhre (s. Abb. 1, A) mit einem Wasserbehälter verbunden.

ergaben einen mittleren Fehler bei *Einzelbestimmungen* von etwa 0,003 Vol.-Proz. Für meine Zwecke war dies vollkommen ausreichend. Eine CO_2-Analyse ist in etwa 2 Minuten ausgeführt, ich konnte bei 2 bis 5 Minuten Assimilationsdauer im Mittel sechs Versuche pro Stunde durchführen!

Da beim Hereinsaugen der Luftprobe die Küvette (s. Abb. 1, *A*) sich mit Wasser zu zwei Dritteln füllt, so wird das Blatt ganz untergetaucht. Die Infiltrationsprobe wurde deshalb in diesen Versuchen mittels Wasser ausgeführt. Gleich nach der Infiltration wurde die Blattfläche planimetrisch ausgemessen.

Die verschiedenen Stadien der *Assimilationsbestimmung* sind kurz wie folgt:

1. Nachdem das Blatt eingesetzt ist (s. Abb. 1, *A*), wird die im Zimmerlicht gehaltene Küvette mit der CO_2-reichen Luft gefüllt. Zu diesem Zwecke wird die Zuflußröhre mit der Luftbombe[1]), die Abflußröhre mit einer Gasuhr verbunden. Es werden durch die 50 ccm haltende Küvette etwa 2000 ccm Luft hindurchgeleitet, was 3 bis 5 Minuten währt. Die Küvette steht während des Hindurchleitens in dem auf die richtige Temperatur gebrachten Wasserbade. Bei sehr hohen und sehr niedrigen Temperaturen wurde der Füllungsprozeß auf 5 bis 8 Minuten ausgedehnt, damit alle Teile die Temperatur des Bades angenommen hatten.

2. *Sogleich* nach dem Abstellen der Luftmischung wird das Versuchsgefäß dem Lichte exponiert und eine Signaluhr in Gang gesetzt. Bei dem Schlußsignal wird die Luftprobe auf vorhin beschriebene Weise unmittelbar genommen, das Blatt dann infiltriert und ausgemessen.

Den größten Versuchsfehler bei dieser außerordentlich raschen Arbeit bringt die Bestimmung der Assimilationszeit, die nicht genauer als etwa 10 Sekunden eingehalten werden kann. Bei 2½ Minuten Assimilationszeit ist also der Fehler etwa 7 Proz. Ein Blick auf die Kurven lehrt, daß die Parallelbestimmungen häufig nicht mehr voneinander abweichen.

Die bei der Analyse erhaltenen Volumenwerte wurden unter Achtung auf die Temperatur des Versuchsgefäßes und die Spannung des Wasserdampfes in Gewichtswerte umgerechnet.

b) Versuche bei normalem CO_2-Gehalt. In den eben beschriebenen Versuchen war die Kohlensäure im Maximum. Die Diffusion im Versuchsgefäß legt in diesem Falle keine Hindernisse in den Weg für die CO_2-

[1]) Vor der Küvette ist eine mit Wasser gefüllte Waschflasche eingeschaltet.

Aufnahme des Blattes. Ferner sind die CO_2-Mengen so groß, daß die volumetrische Bestimmung vollkommen ausreicht.

Bei dem sehr geringen CO_2-Inhalt der freien Luft muß aber erstens für eine genügende Umrührung gesorgt werden, damit nicht CO_2-Mangel um das Blatt herum eintritt, ferner kann nur eine außerordentlich hohe Exaktheit der CO_2-Analyse zum Ziel führen. Die von mir früher eingeführte Methode der CO_2-Analyse erlaubt die Bestimmung von 0,005 mg CO_2 pro Liter, d. h. etwa 1 Proz. der normalen CO_2-Menge der Luft. Mit Rücksicht auf den Temperaturfaktor wurde jedoch nicht mein früherer Assimilationsapparat[1]) benutzt, sondern es wurde durch die oben beschriebene kleine Küvette ein Luftstrom gesogen. Als kombinierter Aspirator und Analysenapparat diente mein „Glockenapparat"[2]). Bei 150 mm Steighöhe saugt die Glocke 2100 ccm Luft ein, was bei der Genauigkeit der Analyse ausreichte. Manchmal wurde sogar ein etwas kleineres Volumen genommen (s. die Tabellen). Über den Gang der CO_2-Analyse habe ich früher ausführlich berichtet und verweise auf die betreffenden Darstellungen. Die Aufstellung des Apparates ist in Abb. 1 zu sehen.

Die Versuchsdauer wurde auch hier möglichst kurz, 6 bis 15, meistens etwa 10 Minuten gewählt. Vorerwärmung etwa 5 Minuten. Diese kurze Versuchsdauer war schon gemäß der Fragestellung zu fordern. Ich habe aber auch gefunden, daß bei strömender Luft die Blätter im Sonnenschein häufig zu stark transpirieren und infolgedessen bald die Stomata verschließen. Als Beleg mögen die in Tabelle II aufgeführten Versuche dienen, in denen die CO_2-reiche Luftmischung (1,22 Proz.) benutzt wurde.

Tabelle II.

Temperatur °C	Versuchsdauer Min.	Durchgesaugtes Luftvolumen ccm	Stomata am Ende	Assimilation in Einheitsmaß mg
30,5	15	336	voll geöffnet	43,5
30,2	30	487	fast geschlossen	11,9
21,0	30	1436	geöffnet	27,5
28,0	19	431	fast geschlossen	16,4
27,4	40	522	geschlossen	13,7
18,0	15	266	geöffnet	13,1
17,0	20	459	halb geöffnet	10,6

[1]) Der in Svensk bot. tidskr. 1921, S. 61 näher beschrieben wird.
[2]) Diese Zeitschr. 131, 109, 1922, und „Kreislauf der Kohlensäure" 1924, S. 10ff.

Diese Versuche sind vorläufige und die erhaltenen Assimilationswerte sind nicht unmittelbar mit den späteren zu vergleichen. Man sieht jedoch, daß bei 30 bis 40 Minuten Versuchszeit Spaltenverschluß eintritt, während eine Versuchsdauer von 15 Minuten keine Gefahr mitbringt. Daß die Spalten sich bei optimaler Temperatur schneller verschließen, habe ich auch in den späteren Versuchen gefunden. Aus alledem ersieht man, wie außerordentlich wichtig es ist, die Versuchsdauer kurz zu halten und den Spaltenzustand zu kontrollieren.

Auch bei diesen Versuchen bereitet die Zeitbestimmung eine gewisse Schwierigkeit. Die Signaluhr wurde in demselben Augenblick in Gang gesetzt, als die Glocke durch Anhängen des Zuggewichts zu saugen anfing. Die Küvette stand bei der Vorerwärmung in diesem Falle im vollen Lichte, war also anfangs praktisch CO_2-frei. Als Schluß wurde der Augenblick notiert, als die Glocke gegen die Stoppringe der Leitsäulen stieß. Da die Sperrflüssigkeit in dem Glockenapparat sich nicht gleich in das Niveau einstellt, so besteht immer eine Fehlergrenze von etwa 10 bis 15 Sekunden, die aber fast konstant ist. Ein konstanter Fehler entsteht auch dadurch, daß das Versuchsgefäß am Ende nicht entleert wird. Da sein Volumen nur etwa $^1/_{40}$ des durchgesaugten Luftvolumens beträgt, so habe ich diesen Umstand nicht in die Rechnung gebracht.

In sämtlichen Versuchen wurde die Assimilation in „Einheitsmaß", d. h. in Milligrammen CO_2 pro Stunde und 50 qcm Blattfläche und 0,56 mg CO_2 im Liter Luft berechnet. Hierbei wurde eine lineare Abhängigkeit von der CO_2-Konzentration angenommen.

III. Die Temperaturkurve der Atmung.

Als Material für die Atmungsversuche wurden die Blätter von *Solanum tuberosum* gewählt, da diese sich sehr gleichförmig verhalten. Das Studium der Atmung war nicht Hauptzweck der Untersuchung. Die Versuche geben jedoch ein recht zuverlässiges Bild der früher unvollständig bekannten Laubblattatmung.

Die Methodik der Atmungsbestimmung stimmt im wesentlichen mit der oben beschriebenen Methode der Assimilationsbestimmung bei hohem CO_2-Gehalt überein (II., D, a). Die Küvette (Abb. 1, *A*) wurde vor dem Versuch mit freier Luft (0,03 Proz. CO_2) gefüllt, dann in ein dunkel gehaltenes und durch dicke Watteschichten isoliertes Wasserbad von bestimmter Temperatur gebracht. Die Versuchszeit mußte bei den niedrigen Temperaturen ziemlich lang gewählt werden (siehe Tabelle XIII), weil die Atmungsintensität hier sehr schwach ist. Meistens wurden zwei Blätter in die Küvette gebracht. Bei hoher Temperatur genügte häufig eine Versuchsdauer von 5 Minuten. In diesem Falle

wurde die Küvette einige Minuten vorerwärmt. Auch bei der Atmung wurde im Einheitsmaß kalkuliert, um die Ergebnisse mit der Assimilation vergleichen zu können.

In der Abb. 3 ist die erhaltene Atmungskurve dargestellt. Die Kurve hat zwei Optima, das erste bei etwa 40°, das zweite bei etwa 50°. Da die letzte Hälfte der Kurve 1 Monat später als die erste Hälfte ermittelt wurde, so habe ich es vorgezogen, die beiden Teile gesondert anzugeben. Auch wenn ich nicht bestimmt behaupten kann, daß die absolute Atmungsintensität sich von Anfang September bis Anfang Oktober nicht geändert hat[1]), so ist doch der Unterschied sicher nicht groß, wie man aus den korrespondierenden Bestimmungen bei 37 bis 41° ersieht. An dem wirklichen Vorhandensein der Atmungs-

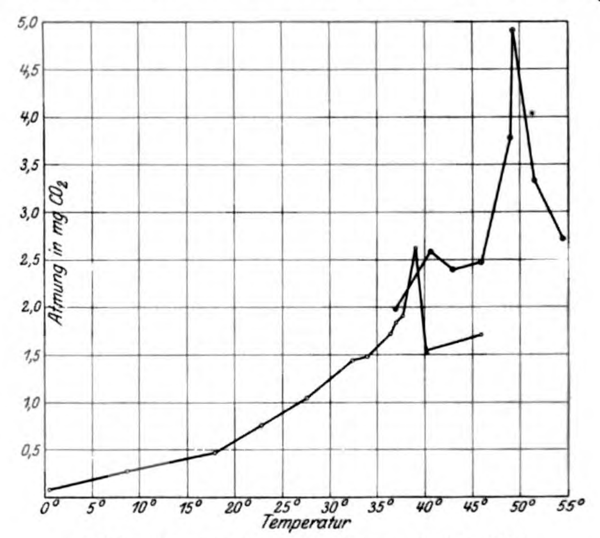


Abb. 3. Atmung von Kartoffelblättern. Tabelle XIII.

depression zwischen 40 und 50° kann ich kaum zweifeln, obwohl die Bestimmungen nicht zahlreich genug sind, um die Form der Kurve genau festzustellen.

Die Werte in Abb. 3 beziehen sich auf eine Versuchsdauer im Temperaturgebiet oberhalb 30° von 5 bis 12 Minuten. Es wurden auch einige Versuche mit verschieden langer Vorerwärmung angestellt. Zu diesem Zwecke wurden die Blätter in Küvetten von 50 ccm Inhalt eingeschlossen und im Wasserbade *bei hellem Tageslicht* gehalten. Die Stomata blieben hierbei ausnahmslos voll geöffnet. Hier folgt eine Reihe bei 40° (Tabelle III).

---

[1]) Es wurde immer dasselbe Individuum benutzt.

Tabelle III.

Versuchs-nummer	Temperatur °C	Dauer der Vorerwärmung Min.	Versuchsdauer Min.	Atmung in Einheitsmaß mg
13	40,1	5	5	1,566
18	40,0	38	17	1,534
14	40,1	74	10	1,409
16	40,2	240	5	1,642
17	40,1	360	15	1,138

Die Atmung hält sich in den ersten 4 Stunden fast konstant bzw. schwankt etwas hin und her. Erst nach 6 Stunden ist eine deutliche Abnahme zu beobachten, *die Blätter sind aber jetzt auch deutlich beschädigt*[1]. *Sogar bei der sehr hohen Temperatur von 40° ist also, solange die Blätter noch lebensfrisch sind, von einem „Zeitfaktor" nichts zu beobachten.*

Auch bei anderen hohen Temperaturen wird anfangs nichts von einem „Zeitfaktor" vermerkt. Im Versuch 9 (Tabelle XIII) liegt der Wert 1,71 mg durchaus in der Reihe, obwohl die Versuchszeit 30 Minuten war (vgl. Versuche 8 und 10 bei 5 Minuten Versuchszeit). Ähnliches gilt von den Versuchen 5 bis 7 bei 27,7 bis 34,0°, wo die Zeit bzw. 50, 32, 28 Minuten betrug. Über 40° tritt die Beschädigung viel rascher auf. In Versuch 22, bei 42,5°, waren die Blätter nach 61 Minuten mit dunklen Punkten besetzt und zeigten stark herabgesetzte Atmung gegenüber den kurz erwärmten.

Bei etwa 50° *treten neue, rein nekrobiotische Erscheinungen auf*, indem die Blätter schon nach 8 bis 9 Minuten vollkommen schlaff sind. *Das zweite endgültige Abfallen der Kurve kann also ohne Berücksichtigung der Zeit nicht dargestellt werden.*

Die von mir ermittelte Atmungskurve der Blätter weicht im Prinzip nicht so sehr von den von *Kujper*[2]) ermittelten Kurven ab, wie man auf den ersten Blick glauben möchte. *Kujpers* nach kürzester Beobachtungszeit (12 bis 30 Minuten) an *Pisum*keimlingen erhaltenen Werte geben nämlich eine Kurve, die bis 40° steigt, dann bis 45° etwas fällt, um bei 50° ein zweites Optimum zu erreichen. Die von mir beobachtete Zweigipfeligkeit findet sich also bei *Kujper* schwach angedeutet. Ein ziemlich ausgedehntes flaches Optimum fand *Claussen*[3]) an Keimpflanzen von *Lupinus* und *Triticum* und Blüten von *Syringa*. *Claussen* hat jedoch sehr lange Vorerwärmung (2 bis 3½ Stunden) verwendet. Sowohl *Claussen*, wie *Kujper* und *Fernandes* haben mit Intervallen

[1]) D. h. stellenweise mit ausgepreßtem Zellwasser infiltriert, was ihnen ein „punktiertes" Aussehen verleiht.

[2]) *Kujper*, a. a. O. 1910.

[3]) *H. Claussen*, Landw. Jahrb. 19, 893, 1890.

von 5° C gearbeitet. Die beim Optimum auftretenden starken Schwankungen bei Temperaturveränderungen von 1° dürften ihnen deshalb entgangen sein.

Mit Blättern haben nur *Kreussler* und *Matthaei* Versuche gemacht. *Kreussler*[1]) benutzt Intervalle von etwa 4 bis 5° und begeht den Fehler, ein und denselben *Rubus*sproß für eine Reihe von Versuchen zu benutzen. Seine Kurve stimmt jedoch in der Hauptsache mit meiner Kurve überein. Miss *Matthaei*[2]) hat, wie sie selbst bemerkt, die Atmungsversuche an Blättern von *Prunus laurocerasus* nur zur Orientierung ausgeführt. Sie beschränkt sich auf sechs Punkte und geht nicht weiter als bis 33°. Noch bei der letzteren Temperatur ist bei *Matthaei* kein Zeitfaktor zu finden (s. a. a. O. 1905, Tabelle I). Neuerdings hat *M. G. Stålfelt*[3]) die Temperaturkurven der Atmung von Kiefer- und Fichtenblättern gezeichnet. Leider werden keine Versuchsdaten mitgeteilt, es geht jedoch aus den Kurven hervor, daß bei etwa 27° ein erstes (?) Optimum auftritt. Dann folgt eine Periode mit sehr wechselnden Atmungswerten, *Stålfelt* hat aber diesen Endteil der Kurve nicht näher erforscht und es bleibt also unentschieden, ob noch ein zweites Optimum aufträte.

Die von mir aufgefundene Zweigipfeligkeit des Optimums steht also bisher fast isoliert. Die Kurve gliedert sich in vier Phasen: 1. Die relativ gleichmäßige Steigung (Q_{10} 1,9 bis 3,3, vgl. unten) vom Minimum bis zum ersten Optimum bei etwa 40°; 2. die Phase der stark wechselnden Atmung von 40 bis etwa 46°; 3. die nochmalige starke Steigung bis zum zweiten Optimum bei etwa 50°; 4. die Phase des endgültigen, nekrobiotisch bedingten Fallens der Kurve jenseits etwa 50°.

Die dritte Phase der Kurve bildet eine vergrößerte Wiederholung des starken Anstiegs bis zum ersten Optimum. Das Protoplasma tritt offenbar bei etwa 40° in eine Phase starker thermischer Labilität ein, so daß sich sein Zustand bei jeder weiteren Temperatursteigerung rasch ändert. Diese thermischen Zustände treten beinahe momentan ein und bleiben dann konstant, so etwa, wie sich die Viskosität eines Kolloids mit der Temperatur ändert, bis sekundäre, rein nekrobiotische Vorgänge einsetzen, *die mit der Zeit fortschreiten*. Je höher die Temperatur, um so kürzer dauert der primäre thermische Zustand. Das Bestimmen der idealen Atmungskurve *oberhalb 50°* ist praktisch undurchführbar. Daß das zweite, hohe Optimum früheren Forschern entgangen ist, hat höchstwahrscheinlich eben seinen Grund darin, daß es bei längerer Versuchsdauer verschwindet.

---

[1]) *U. Kreussler*, Landw. Jahrb. **16**, 711, 1889.
[2]) *Gabrielle Matthaei*, a. a. O. 1905.
[3]) *M. G. Stålfelt*, Skogsvårdsfören. tidskr. Stockholm 1923, S. 282.

Die Bestimmung von Q_{10} gibt nur für die erste Phase brauchbare Werte. Ich habe aus der Kurve durch graphische Interpolierung[1]) folgende Reihe berechnet:

$$\begin{array}{ll} & 0 - 10 - 20 - 30 - 40 - 50^0 \\ Q_{10} = & 3{,}3 \quad 1{,}9 \quad 2{,}1 \quad 2{,}1 \quad 1{,}9 \\ & 5 - 15 - 25 - 35 - 45 - 55^0 \\ Q_{10} = & 2{,}1 \quad 2{,}2 \quad 1{,}8 \quad 1{,}6 \quad 1{,}1 \end{array}$$

Der anfangs hohe, dann auf etwa 2 sinkende Q_{10}-Wert stimmt mit den übrigen Erfahrungen. Von dem Kurventeil oberhalb etwa 37⁰ gibt die Q_{10}-Bestimmung überhaupt keine Vorstellung. Der letzte Anstieg zu den Optima ist ja außerordentlich intensiv und würde Q_{10}-Werte geben, die viel höher als die bisher gefundenen sind (> 40). Ich finde es aber kaum zulässig, aus diesen Kurventeilen Q_{10} zu kalkulieren, da sowieso die Gesetzmäßigkeit, die die Reaktionsgeschwindigkeitstemperaturkonstante reguliert, unbekannt ist.

IV. Die Temperaturkurven der Assimilation.

Die betreffenden Versuche sind in den Tabellen im Anhang aufgeführt.

Ein Blick auf dieselben und auf die graphischen Darstellungen zeigt die große Bedeutung des Kohlensäurefaktors und des Lichtfaktors für den Temperatureinfluß.

1. Kohlensäurekonzentration und Licht im Maximum.

Wenn die Kohlensäurekonzentration der Luft und das Licht beide im Maximum ihrer Wirkung sind[2]), so entstehen Temperaturkurven wie in der Abb. 4. Die drei Objekte zeigen große Ähnlichkeit des Reagierens, aber auch gewisse Unterschiede. Besprechen wir zuerst *die übereinstimmenden Züge* der Kurven.

Die Kurve steigt von 2 bis 4⁰ an anfangs rasch. Q_{10} beträgt für 0 bis 10 bzw. 5 bis 15⁰ (bei Kartoffeln) 5,0, 5,6, 6,4. Noch bis 20⁰ ist der Temperaturquotient recht hoch (bzw. 3,86, 2,47, 2,9). Bei dieser Temperatur herum findet aber offenbar eine innere Bedingungsänderung statt, weil die Kurve bei Kartoffel und Gurke eine *konvexe* Biegung macht. Oberhalb 20⁰ ist Q_{10} schon bedeutend geringer (bzw. 1,60, 1,68 bis 2,06, 1,64). Dann folgt eine sehr steile Steigerung zum Optimum

[1]) Da ich beim Zeichnen der Kurven *immer nur wirklich ermittelte Punkte verbunden habe*, so täuschen die interpolierten Werte keine falsche Exaktheit vor. Die Art der objektiven Interpolierung ist auch meines Erachtens zuverlässiger als die Berechnung von Q_{10} aus beliebigen Intervallen nach einer vom biologischen Gesichtspunkt hypothetischen Formel, wie dies *Kanitz* (a. a. O. 1915) macht.

[2]) Über das Relativitätsgesetz der Assimilation siehe *Lundegårdh*, Kreislauf der Kohlensäure, S. 78.

hinauf, das scharf zugespitzt ist. Das Abfallen der Kurve erfolgt zuerst langsam, dann rascher, das Gebiet vom Optimum bis zum Maximum — d. h. dem Schnittpunkt der Kurve mit der Abszisse — umspannt 10 bis 14°.

Ausführliche Versuche über den Temperatureinfluß auf die Assimilation hat, wie eingangs erwähnt, unter früheren Forschern nur Miss *Matthaei* veröffentlicht[1]). Die von ihr (a. a. O., Abb. 6) gegebene vollständige Kurve ist zwar aus mehreren zu verschiedener Jahreszeit aufgenommenen Teilstücken zusammengesetzt, sie verrät aber unverkennbare Ähnlichkeiten mit meinen Kurven, so der rasche Anstieg bis

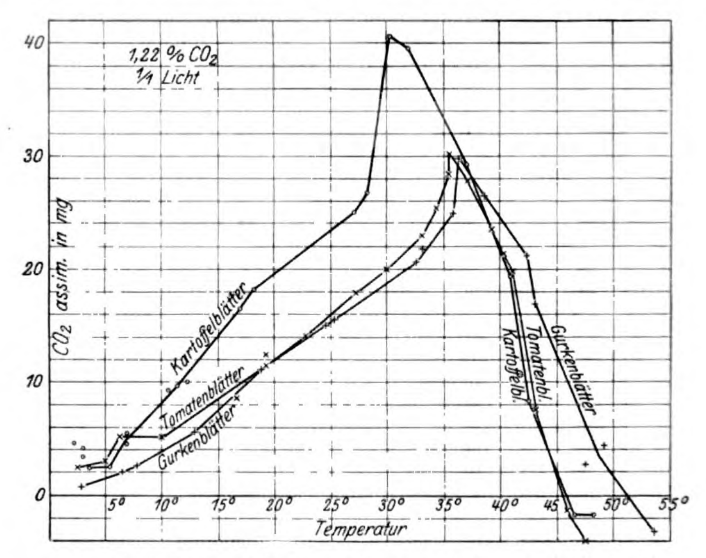


Abb. 4. Assimilation bei Maximalbedingungen. Tabellen XIV, XIX, XXII.

10 oder 15° und die konvexe Biegung bei 15 bis 20°. Der Anstieg bis zum Optimum erscheint bei *Matthaei* nicht so steil wie bei mir, und das Abfallen der Kurve ist viel zu schnell, dies kann aber darauf beruhen, daß die Versuchszeit sehr lang war (vgl. Einleitung). Bis zur Maximumtemperatur der Assimilation ist *Matthaei* nicht gegangen.

Willstätter und *Stoll*[2]) haben nur den mittleren Teil der Temperaturkurven von Ulme und Hollunder bestimmt. Für sie kam es auf den Vergleich der Temperaturkoeffizienten an. In Tabelle IV führe ich die bisher bekannten Werte von Q_{10} auf.

---

[1]) A. a. O. 1905. Eine Besprechung der Pionierversuche von *Kreussler* (1889) kann hier unterbleiben, da die von *Matthaei* an ihnen geübte Kritik in der Hauptsache zutreffend ist.

[2]) *Willstätter* und *Stoll*, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure 1918, S. 159.

Tabelle IV.

Temperaturquotient Q_{10} der Assimilation.

Pflanze	0—10 °C	5—15 °C	10—20 °C	15—25 °C	20—30 °C	Autor
Kirschlorbeer . .	2,40	—	2,12	—	1,76	*Matthaei*
Ulme, grün . . .	—	—	—	1,48	1,29	*Willstätter* u. *Stoll*
„ gelb . . .	—	—	—	1,30	1,07	
Holunder, grün .	—	—	—	1,52	1,45	
Gurken	—	5,0	3,86	2,06	1,60	Verfasser
Kartoffeln	—	5,6	2,47	1,68	2,06	
Tomaten	—	6,4	2,9	1,93	1,64	
Chlorella	4,7—5,0	—	2,1	2,0	1,6	*Warburg*[1])

Der Wert des Q_{10} für die Beurteilung der Temperaturabhängigkeit der Atmung und der Assimilation ist, wie gesagt, ziemlich beschränkt, weil diese Vorgänge und namentlich die Assimilation sogar nicht innerhalb 10° sich mit der Temperatur in konstantem Verhältnis ändert. Die auffallende Geschwindigkeitsänderung bei etwa 20° und der sehr starke, aber nur wenige Grad umspannende Anstieg zum Optimum tritt bei der Q_{10}-Berechnung nicht genügend stark hervor. Logischer wäre es, den Temperaturquotienten für 1° Intervall, also Q_1 als Vergleichsmaß zu benutzen, wobei eben die charakteristischsten Strecken der Kurve herausgegriffen werden können. In Tabelle V habe ich diese Berechnung für mein Material durchgeführt.

Tabelle V.

Temperaturquotient Q_1 der Assimilation.

Pflanze	5° C	10° C	15° C	20° C	25° C	30° C	35° C	40° C	45° C	49° C
Gurken	1,26	1,16	1,16	1,06	1,04	1,04	**1,20**	0,94	0,77	—
Tomaten . . .	—	1,11	—	1,07	1,05	1,05	**1,17**	0,92	—	—
Kartoffeln . .	1,31	1,12	1,09	1,04	1,03	**1,45**	0,94	0,89	0,08	—
„ Atmung	1,08	1,08	1,06	1,10	1,07	1,07	1,06	**1,29**	1,01	**1,46**

Anmerkung. Die Werte sind aus den Kurven[2]) nach Gleichung $Q_1 = \frac{a_{t_0} + 1}{a_{t_0}}$ berechnet, wo a = die jeweilige Assimilations- bzw. Atmungsintensität bedeutet. Für die Optima, die fett gedruckt sind, wurde a_t = die optimale Intensität genommen, die am Kopf gedruckten Temperaturgrade sind also hier nur ungefähr zu nehmen.

Die in der letzten Zeile mitgenommenen Q_1-Werte der Atmung ermöglichen einen besseren Vergleich mit der Assimilation, als die Q_{10}-Werte vermitteln würden. Die Atmungskurve ist im großen ganzen

[1]) *Warburg*, diese Zeitschr. **100**, 258, 1919.

[2]) Diese graphische Interpolierung gibt natürlich nur Annäherungswerte, die aber für eine Übersicht über die relative Temperaturabhängigkeit ausreichen.

die regelmäßigere[1]). Die Temperaturabhängigkeit der Assimilation ist bei 5 bis 15° zum Teil bedeutend größer als die der Atmung. In dem mittleren Gebiet ist das Umgekehrte der Fall. Zu dem komplizierten Verlauf des Optimums bei der Atmung findet sich bei der Assimilation kein Gegenstück. Dagegen ist der letzte Anstieg der Kurven vor dem Optimum fast gleich (Q_1 in beiden Fällen 1,45 bis 1,46), obwohl die Lagen der Optima um 10 bis 20° auseinander gehen. Die Kurven gehen überhaupt nicht parallel, was auf einen weitgehenden Unterschied in dem chemischen Mechanismus hindeutet. Das Assimilationsoptimum tritt ganz selbständig auf. Auch die Form des abfallenden Astes deutet auf einen ganz charakteristischen Verlauf der assimilationshemmenden Vorgänge hin.

Die Frage des Zeitfaktors wurde durch einige Versuche mit Gurkenblättern berührt. Die betreffenden Versuche sind in Tabelle VI aufgeführt (näheres in Tabelle XXII, Anhang).

Tabelle VI.

Zeitfaktor bei Gurkenassimilation.

Versuchs-nummer	Temperatur °C	Dauer der Vorerwärmung Min.	Versuchsdauer Min.	Assimilation mg
9	32,3	5	2	17,0
10	32,3	60	2	20,5
16	35,6	5	2,5	19,8
17	35,7	10	2,5	25,0
18	37,0	5	2	20,9
20	37,0	15	2,5	18,3
22	38,4	5	2,5	26,4
23	38,2	15	2	23,3
21	38,6	35	2	21,6
24	38,3	60	2	19,9
29	43,0	5	2	16,9
30	43,0	30	2	10,5
31	43,0	58	2	7,38
32	43,0	130	2	8,00

Die Versuche bei 32,3° sind wegen der Variation der Werte (Tabelle XXII, Anhang) nicht eindeutig. Man kann doch sagen, daß die Assimilationsintensität hier in der ersten Stunde fast konstant ist oder vielleicht etwas steigt. Bei 35,7° ist schon nach 10 Minuten eine deutliche Steigung zu beobachten. Man befindet sich hier gerade

[1]) Die Tatsache, daß die mitgeteilten Assimilationskurven *ökologisch* sind, d. h. die gleichzeitige Atmung mit enthalten, kann hier vernachlässigt werden, weil die Atmung gegenüber der unter so günstigen Bedingungen stattfindenden Assimilation ganz verschwindet (s. Tabelle XIII im Vergleich zu Tabelle XIV).

am Optimum, wo schon zehntel Grade die Assimilation stark verschieben. Ganz genaue Bestimmungen sind hier experimentell sehr schwer erreichbar.

Bei der überoptimalen Temperatur von 38,2 bis 38,6° wurde eine recht überzeugende Zeitreihe erzielt, die hier langsam *fällt*. Bei 43,0° ist ebenfalls ein Sinken der Assimilation zu beobachten.

Die Zeit spielt also beim Gurkenblatt in der Nähe des Optimums wohl sicher mit hinein. Ein Ausdruck hierfür ist auch die auffallend starke Variation der Werte (s. auch Abb. 5), an der das genaue Zeichnen der Kurve scheitert. Wenn nun wirklich schon bei 5 bis 10 Minuten Vorerwärmung (Versuche 19 und 20) eine Erhöhung von etwa 25 Proz.

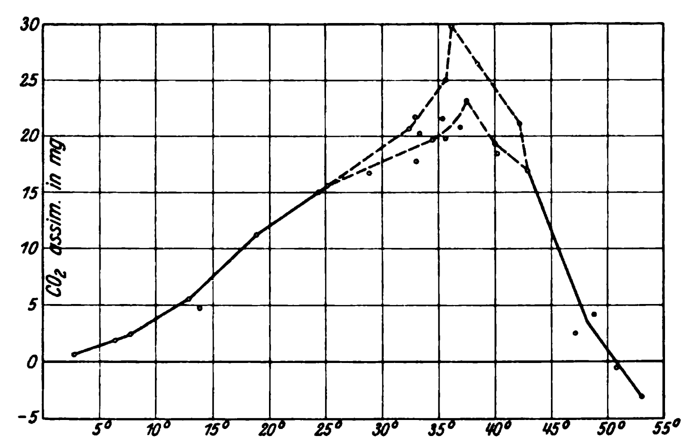


Abb. 5. Assimilation von Gurkenblättern. Veränderlichkeit des Optimums. Tabelle XXII.

stattfindet, so kann jenes nicht wundernehmen. Es ist einfach praktisch unmöglich, die Vorerwärmung *des Blattes* auf eine Minute genau zu bestimmen. Die Befunde bringen die Ergebnisse von *Rutges, de Vries* und *Fernandes* (s. Einleitung) in Erinnerung, die eine begünstigende Zeitwirkung hoher suboptimaler Temperaturen fanden. Vielleicht ließe sich das Anschnellen des Temperaturquotienten kurz vor dem Optimum einfach aus solchen Zeitkurven erklären. Auf der linken Seite des Optimums wäre dann eine Tendenz zur *Erhöhung*, auf der rechten Seite eine Tendenz zur *Senkung* (abfallende Zeitkurven), und so würde die jeweilige Form dieser Kurvenschar nicht nur die Höhe, sondern auch die Lage des Optimums bestimmen. Ich habe in Abb. 5 zwei solche Optimumlagen angedeutet. Es seien auch die Untersuchungen *Talmas* erwähnt, wo ebenfalls eine veränderte Lage des Optimums mit der Zeit festgestellt wurde.

Die hier entwickelten Ansichten würden gewissermaßen eine Erweiterung der *Blackman*schen Theorie vorstellen. Der weiteren Ver-

folgung der Sache stehen aber, wie erwähnt, sehr große experimentelle Schwierigkeiten im Wege. Aus diesem Grunde und weil dieses bei Maximalbedingungen auftretende Optimum für die unter natürlichen Verhältnissen lebenden Pflanzen bedeutungslos ist, habe ich mich in diesen Punkt nicht weiter vertieft.

Es sei betont, daß es sich bei einer Mitwirkung des Zeitfaktors für die Ausgestaltung des Optimums *sicher nicht um eine generelle Erscheinung handelt*. Wir haben schon bei der *Atmung* der Kartoffelblätter erfahren, daß hier *der Zeitfaktor keine Rolle spielt*, solange die Blätter noch gesund sind. Ähnliches dürfte für die *Assimilation der Kartoffeln gelten*. Ein Beleg hierfür ist der in Tabelle VII aufgeführte Versuch.

Tabelle VII.
Zeitfaktor bei Kartoffelassimilation.

Nr.	Temperatur		Dauer der Vorerwärmung	Assimilation	Stomata
	°C	°C	Min.	mg	
1	34,4	± 0,0	7	34,1	3 : 5
2	35,1	± 0,1	60	25,8	4 : 5
3	34,6	± 0,0	120	33,2	9 : 10

Direkt vergleichbar sind Versuche 1 und 3. Die Assimilation hält sich bei der überoptimalen Temperatur von 34,4 bis 34,6° konstant in wenigstens 2 Stunden. Der Versuch 3 wurde bei etwas höherer Temperatur vorgenommen, woraus sich zum Teil der niedrigere Assimilationswert erklärt.

Bei Tomatenblättern wurden Zeitversuche angestellt, teils in der suboptimalen Temperatur von 32,9°, wo nach 120 Minuten Vorerwärmung (im Lichte) ein Assimilationswert erhalten wurde, der vollkommen in der Kurve liegt (Versuch 11, Tabelle XIX, Anhang), teils gerade bei dem Optimum 35,5°, wo nach 60 Minuten Vorerwärmung eine kleine Erhöhung von 28,5 (Versuch 13, Tabelle XIX, Anhang) auf 30,3 (Versuch 14) beobachtet wurde, die innerhalb der Versuchsfehler liegt. *Auch für die Tomatenblätter ist also die ermittelte Assimilationskurve nicht von der Zeit mitbedingt.*

Bei sehr langer Vorerwärmung wird das Blatt beschädigt, aber das Sinken der Leistung ist dann rein pathologisch und hat nichts mit dem normalen Optimum zu tun.

Eine Inkonstanz des Optimums kann auch durch Spaltöffnungsbewegungen verursacht sein. Bei Tomaten und Gurken waren die Stomata immer voll geöffnet, bei den Kartoffelblättern war eben in der Nähe des Optimums (auf der suboptimalen Seite) eine Tendenz zum Schließen vorhanden (s. Tabelle XIV, Anhang). Es ist möglich, daß ein langsam erfolgender Verschluß der Stomata bei *Matthaei*

(a. a. O. 1905) ein Grund des Abfallens der Assimilationstätigkeit war. Oder es traten bei der stundenlang ausgedehnten Beobachtungszeit pathologische Erscheinungen auf[1]). Das Extrapolieren einer solchen Kurve auf die Beobachtungszeit Null ist, wie oben gezeigt, sowieso unzulässig.

Obwohl die Temperaturkurven der drei untersuchten Pflanzenarten der Form nach einander sehr ähnlich sehen, so differieren sie doch in betreff der Höhe und der Lage der Kardinalpunkte. Die Kartoffelblätter zeichnen sich durch eine bedeutend intensivere Assimilationstätigkeit aus. Das Optimum wird aber schon bei 30° erreicht, gegen etwa 35,5° bei Tomaten und etwa 36 bis 37° bei Gurken. Das Maximum bei Tomaten und Kartoffeln ist identisch etwa 46° und der ganze abfallende Ast hat einen sehr ähnlichen Verlauf. In dem aufsteigenden Ast stimmen wiederum Gurken und Tomaten überein.

Das Minimum wurde nicht näher bestimmt. Der Verlauf der Kurven ist unterhalb 5° unsicher, bei den Kartoffeln hat es sogar den Anschein, als ob zwischen 2 und 4° die Assimilation mit der Abkühlung *stieg* (s. Tabelle XIV, Versuche 1 bis 3), weitere Versuche sind aber hier noch nötig.

2. Kohlensäurekonzentration oder Licht oder beide im Minimum[2]).

Um die Interferenz der drei Faktoren CO_2, Licht und Temperatur zu studieren, wurden bei Kartoffeln folgende Versuchsreihen angestellt (s. Tabellen XIV bis XVIII, Anhang).

1. $^1/_1$ Licht und 1,22 Proz. CO_2
2. $^1/_1$ „ „ 0,03 „ CO_2
3. $^1/_{25}$ „ „ 1,22 „ CO_2
4. $^1/_{25}$ „ „ 0,03 „ CO_2

Man kann die Ergebnisse auf vierfache Weise gruppieren, um die Wirkung eines Übergangs eines Faktors vom Minimum zum Maximum zu sehen; s. die Abb. 6 bis 10.

Als übereinstimmender Zug derjenigen Kurven, wo ein Faktor — Licht oder Kohlensäure — im Minimum ist, tritt beim ersten Blick

---

[1]) Bei langdauernder optimaler Assimilation findet auch eine Anhäufung von Assimilationsprodukten statt, wodurch die Intensität der CO_2-Zerlegung herabgesetzt wird (s. *Lundegårdh*, a. a. O. 1924, S. 92, 95, 117).

[2]) Auch bei diesen Versuchen beeinflußt die Atmung in keinem Falle *wesentlich* den Kurvenverlauf. Die reinen Assimilationskurven würden etwas *höher* verlaufen, die Minima um etwa 1 oder 2° *später* einsetzen als die hier dargestellten direkten, *ökologischen* Kurven. Da die Kurven keiner mathematischen Behandlung, sondern nur einer grundlegenden ersten Analyse unterworfen werden, habe ich die Korrektion in bezug auf die Atmung — die bei Kartoffeln aus Tabelle XIX leicht durchführbar ist — hier unterlassen.

die auf niedrigere Temperatur zurückversetzte Lage des Optimums hervor. Unter maximalen Assimilationsbedingungen (Licht $^1/_1$, CO_2 1,22 Proz.) wird das Optimum erst bei etwa 30° erreicht. Unter mini-

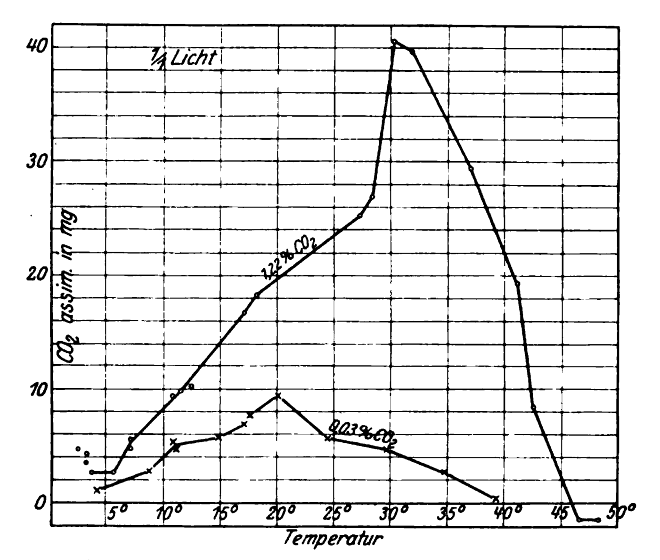


Abb. 6. Assimilation bei starkem Licht. Tabelle XIV und XVI.

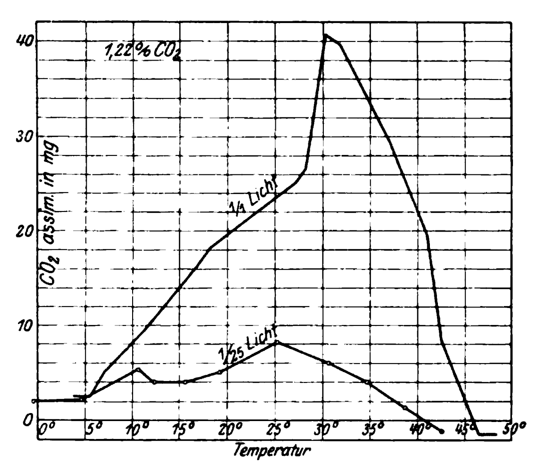


Abb. 7. Assimilation bei hohem CO_2-Gehalt. Tabelle XIV und XV.

malen Assimilationsbedingungen (Licht $^1/_{25}$, CO_2 0,03 Proz.) findet die stärkste Kohlensäurebindung schon bei 18 bis 19° statt. Wenn nur die Kohlensäure im Minimum ist, liegt das Optimum bei 20°, wenn nur das Licht im Minimum ist, bei etwa 25°.

Mit der Feststellung, daß *eine typische Optimumkurve auch dann entsteht, wenn Licht oder Kohlensäure im Minimum sind*, wird die bisher herrschende, von *Blackman* und *Matthaei* entwickelte Ansicht widerlegt. *Matthaei* hat, wie schon eingangs erwähnt, zu wenig Punkte an ihren Kurven ermittelt. Das Optimum ist ihr entgangen.

Meine Ergebnisse bringen eine Bestätigung und einen weiteren Ausbau des Relativitätsgesetzes der Assimilation.

In Übereinstimmung mit dem Relativitätsgesetz wird, wenn sowohl Licht als Kohlensäure im Minimum sind, eine Erhöhung nur des einen Faktors die Assimilation erhöhen. Siehe hiervon Abb. 7 (Erhöhung des Lichtfaktors) und Abb. 6 (Erhöhung des CO_2-Faktors). Wenn man unter Interpolierung auf ganze Temperaturgrade die Quotienten

$$\frac{\text{Assimilation } CO_2 \,.\, 1{,}22 \text{ Proz.}}{\text{Assimilation } CO_2 \,.\, 0{,}03 \text{ Proz.}} \text{ und } \frac{\text{Assimilation Licht } ^1/_1}{\text{Assimilation Licht } ^1/_{25}}$$

bildet, so zeigt es sich, daß die relative Erhöhung der Assimilation in dem mittleren Temperaturgebiet zwischen 1,9 und 4,9 variiert (siehe Tabelle VIII).

Tabelle VIII.

Relative Ausnutzung des Lichts und der Kohlensäure.

Temperatur	4° C	10° C	16° C	20° C	26° C	30° C	38° C
Fall 1: 0,03 Proz. CO_2. Licht $^1/_1$ zu $^1/_{25}$.							
$\frac{\text{Assimilation Licht } ^1/_1}{\text{Assimilation Licht } ^1/_{25}} =$	1	2,1	4,9	4,2	2,8	2,4	∞
Fall 2: 1,22 Proz. CO_2. Licht $^1/_1$ zu $^1/_{25}$.							
$\frac{\text{Assimilation Licht } ^1/_1}{\text{Assimilation Licht } ^1/_{25}} =$	1	1,9	3,0	3,5	3,0	6,1	15,0
Fall 3: $^1/_{25}$ Licht. CO_2 1,22 zu 0,03 Proz.							
$\frac{\text{Assimilation } CO_2 \text{ 1,22}}{\text{Assimilation } CO_2 \text{ 0,03}} =$	2,4	2,2	3,2	2,3	4,1	3,2	∞
Fall 4: $^1/_1$ Licht. CO_2 1,22 zu 0,03 Proz.							
$\frac{\text{Assimilation } CO_2 \text{ 1,22}}{\text{Assimilation } CO_2 \text{ 0,03}} =$	2,0	2,1	2,4	2,1	4,5	10,2	24,6

Weitgehendere Schlüsse will ich nicht aus diesen Annäherungswerten ziehen, es fällt jedoch auf, daß die relative Ausnutzung des einen Faktors in einem mittleren Temperaturgebiet ziemlich unabhängig zu sein scheint von der Intensität des anderen Faktors. Besonders gut ist die Übereinstimmung zwischen Fall 3 und 4. Die Ausnutzung der Kohlensäure ist hier in dem Temperaturbereich von 4 bis 26° praktisch fast unabhängig von der Lichtintensität. Die größte Abweichung ist bei 16°, wo auch die Werte in Fall 1 und 2 stark auseinandergehen.

Von 10^0 herab fällt der Quotient rasch in den Fällen 1 und 2. Oberhalb 30^0, also in der Nähe des „hohen" Optimums, steigt der Quotient außerordentlich rasch in sämtlichen Fällen, was darauf beruht, daß das hohe Optimum nur dann auftritt, wenn alle Faktoren im Überschuß wirken. Die relative Ausnutzung des Lichtes und der Kohlensäure ist also eine Funktion der Temperatur, und zwar steigt sie mit steigender Temperatur, obwohl nicht kontinuierlich, sondern periodisch.

Wir haben aus der bisherigen Darstellung zwei Optima kennengelernt: das „hohe" Optimum bei etwa 30^0 und das „mittlere" Optimum bei etwa 20^0. Das hohe Optimum erscheint nur unter den günstigsten Bedingungen. Wenn ein Faktor in Minimum gerät, fehlt die Möglichkeit zu diesem kolossalen Anstieg der Assimilation bei 30^0. Die Höchstleistung wird schon bei 20^0 erreicht. Aber ein Einfluß des hohen

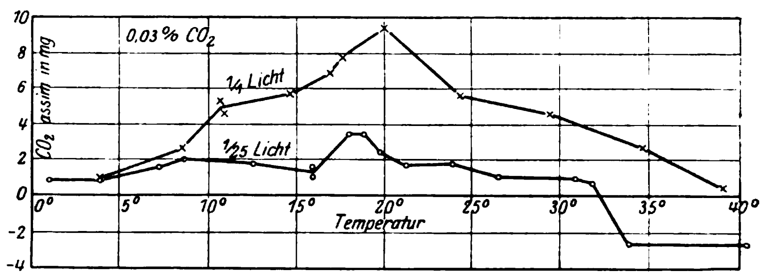


Abb. 8. Assimilation bei niedrigem CO_2-Gehalt. Tabelle XVI und XVIII.

Optimums ist doch ganz deutlich zu beobachten: Der abfallende Ast der einen 0,03 Proz. CO_2-Kurve ist bei 30^0 nicht unerheblich gehoben (Abb. 8, obere); die andere 0,03 Proz. CO_2-Kurve (Abb. 8, untere) fällt gerade nach 30^0 steil herab. Ganz entsprechende Verhältnisse kommen bei den Tomatenblättern zum Vorschein (Abb. 10).

Umgekehrt ist in der 1,22 Proz. CO_2-$^1/_1$-Lichtkurve unverkennbar ein Einfluß des mittleren Optimums zu sehen, und zwar in der konvexen Biegung bei etwa 18^0[1]) (Abb. 6 und 7). Bei den Tomatenblättern kann ebenfalls das mittlere Optimum gespürt werden, dieses ist aber hier überhaupt schwächer ausgebildet (Abb. 10)[2]).

[1]) Wären mehr Punkte ermittelt worden, ließe sich die Lage genauer bestimmen.

[2]) Die hohe Kurve in Abb. 10 ist im mittleren Gebiet (15 bis 30^0) fast eine gerade. Eine lineare Temperaturabhängigkeit fand *A. Krogh* in einem mittleren Temperaturgebiet (Zeitschr. f. allgem. Physiol. **16**, 166, 1914) bei der embryonalen Entwicklung des Frosches. Ob dieser und ähnliche in der Literatur erwähnte Fälle sich durch den Einfluß eines mittleren Optimums erklären lassen, bleibt zu untersuchen.

Es gibt nun noch einen dritten charakteristischen Punkt der Temperaturkurven, der folgerichtig als das „niedrige“ Optimum bezeichnet werden soll, nämlich in der Umgebung von 10⁰. In dem $^1/_{25}$ Licht (Abb. 9) ist eine wirkliche Erhebung der Kurve bei 9 bzw. 10⁰ vorhanden. Von diesem niedrigen ersten Optimum ab fällt die Kurve schwach bis zu etwa 15⁰, wo sich das zweite, mittlere Optimum anzuheben beginnt. In der 0,03 Proz. CO_2-$^1/_1$-Lichtkurve ist ebenfalls ein deutlicher Einfluß des ersten Optimums vorhanden. Die Kurve zeigt bei 11⁰

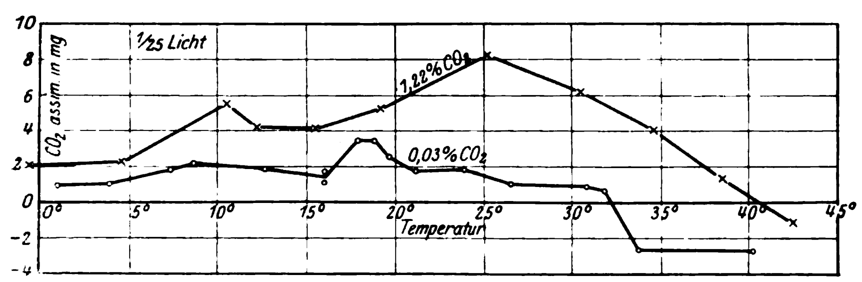


Abb. 9. Assimilation bei schwachem Licht. Tabelle XV und XVIII.

eine scharfe konvexe Biegung. Nur in der 1,22 Proz. CO_2-$^1/_1$-Lichtkurve ist das erste Optimum verwischt, aber bei den Tomatenblättern macht es sich deutlich kenntlich. Es tritt in diesem Falle schon bei etwa 6⁰ auf (Abb. 10).

Für die drei Optima gilt, *daß sie nur bei einer gewissen jeweiligen Konstellation der Assimilationsfaktoren als wirkliche Höchstleistungen erscheinen*. Das erste niedrige Optimum (10⁰) wird voraussichtlich bei sehr schwachem Lichte und schwacher Kohlensäurekonzentration den Höchstpunkt der Kurve darstellen (vgl. Abb. 11, unterste Kurve). Das zweite mittlere Optimum (20⁰) tritt bei einer schwachen bis mittleren Intensität des Lichtes und des CO_2-Faktors auf und ist das „Normaloptimum“ in ökologischer Hinsicht, weil es unter den normalen Bedingungen der Lichtpflanzen auftritt. Das dritte hohe Optimum wird im normalen Leben der Pflanzen wohl niemals erreicht, weil es erst bei hoher Kohlensäurekonzentration und starkem Lichte auftritt.

Die absolute Höhe der Optima steigt in der Reihe. Und die niedrigeren Optima werden in dem Maße verwischt, wie ein Optimum höheren Grades erreicht wird.

Der an der Hand der Assimilation der Kartoffelblätter geführte Nachweis von drei Optimumgebieten dürfte eine generelle Bedeutung haben. Nicht so, daß die Optima immer an denselben Temperaturpunkten auftreten sollten. Aber die Existenz von drei getrennten Optimumpunkten ist sicher eine generelle Eigenschaft der assimilierenden Blätter, sonst würden die Assimilationskurven von drei klimatisch und

habituell so verschiedenen Typen wie Kartoffel, Tomate und Gurke sich im Detail nicht so ähnlich sehen.

Von der Tomate war schon die Rede (s. Abb. 10). Das erste Optimum tritt hier bei 6⁰ auf und ist noch bei maximalem Lichte und CO_2-Faktor scharf kenntlich. Das zweite Optimum liegt, wie bei Kartoffeln, bei 20⁰. Dieses Optimum ist schwächer ausgebildet und wird in der hohen Kurve nur als Abflachung gespürt. Das hohe Optimum finden wir bei etwa 34,5⁰. An diesem Punkte beginnt auch die mittlere

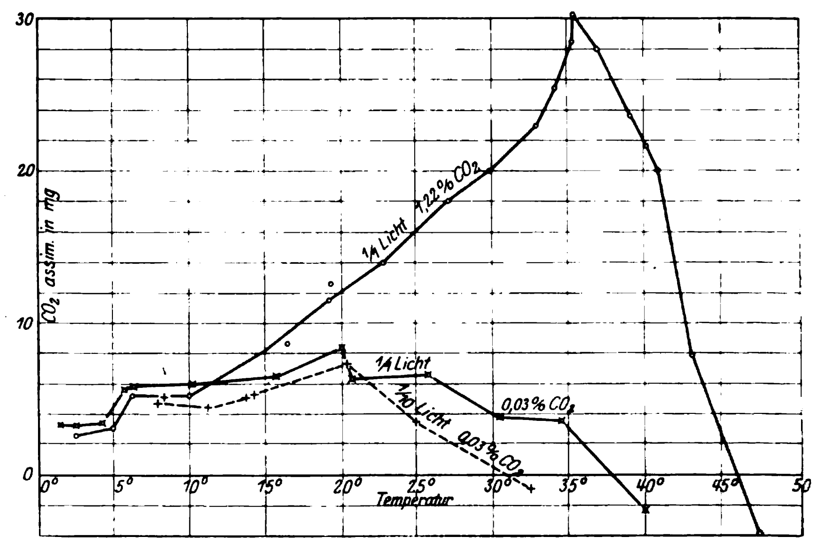


Abb. 10. Assimilation der Tomatenblätter. Tabelle XIX und XXI.

Kurve stark zu fallen (Abb. 10). Die Verhältnisse liegen also so wie bei den Kartoffeln. Nur ist die Lage und die jeweilige Höhe der Optima eine andere.

Bei den Gurken wurden keine Versuche unter Minimumbedingungen ausgeführt. Aber die hohe Kurve verrät genau dieselben Merkmale wie die Kartoffel- und Tomatenkurven. Die starke Erhebung der Kurve bei etwa 19 bis 20⁰ läßt vermuten, daß bei Gurken das mittlere Optimum scharf ausgeprägt ist. Dagegen ist von einem ersten niedrigen Optimum nichts zu beobachten. Das hohe Optimum findet man bei Gurken erst bei 36 bis 38⁰ und bei verhältnismäßig viel geringerer absoluter Assimilationsintensität als bei Kartoffeln und Tomaten.

Diese spezifischen Unterschiede in der Höhe der Kurven, sowie besonders in der Lage der Optima, sind natürlich in pflanzengeographischer Hinsicht von sehr großem Interesse. Eine nähere Betrachtung dieser Seite des Problems soll aber hier unterbleiben.

V. Zur Theorie der Assimilation.

Nach *Willstätter*[1]) vollzieht sich der Assimilationsvorgang auf folgende Weise.

1. Die Kohlensäure wird durch einen vom Lichte unabhängigen Vorgang von der Blattsubstanz aufgenommen und in eine reaktionsfähigere Form übergeführt.

2. Dieses Kohlensäurederivat verbindet sich mit dem Chlorophyll zu einer Chlorophyllkohlensäureverbindung.

3. Durch Aufnahme von Lichtenergie wird die Chlorophyllkohlensäureverbindung in eine energiereichere Verbindung von Peroxydkonstitution umgelagert.

4. Das Peroxyd zerfällt, unter Mitwirkung eines „Assimilationsenzyms", ohne erhebliche Wärmetönung in Chlorophyll, Sauerstoff und Formaldehyd, aus dem durch Polymerisation Hexose entsteht.

Spätere Forscher, *O. Warburg*[2]) und *K. Noack*[3]), haben die Vorgänge in 4. abweichend aufgefaßt. Nach *Warburg* wird in dem sogenannten photochemischen Primärvorgang das Chlorophyll durch Aufnahme von Lichtenergie aktiviert und reagiert chemisch mit dem „Akzeptor", d. h. der in „reaktionsfähige Form" übergeführten Kohlensäure. Neuerdings scheint aber *Warburg*[4]) die Hypothese der Akzeptorbildung wieder zu verlassen und schließt sich der *Willstätter*schen Vorstellung von einer Peroxydbildung an (Vorgang 4, oben).

Gehen wir also von *Willstätters* Theorie als der vorläufig annehmbarsten aus, so ergibt sich im Hinblick auf die drei Faktoren Licht, Kohlensäure und Temperatur folgendes.

Wenn wir bei Konstanz übriger Bedingungen die Bestrahlungsintensität herabmindern, so sinkt die assimilatorische Leistung, weil in diesem Falle Vorgang 3 gebremst wird. Da nun photochemische Reaktionen ein Q_{10} von fast 1 besitzen, also sehr wenig von Temperaturänderung beeinflußt werden, so würde man erwarten, daß die Temperaturkurve bei schwachem Lichte bald in eine horizontale Linie überginge, wie dies auch *Blackman* und *Matthaei* annehmen. Wir fanden aber Optimumkurven (Abb. 8). Aus Abb. 8 sehen wir, daß bei schwachem Lichte *und* niedrigem CO_2-Gehalt die Kurve dem *Blackman*schen Schema nachstrebt, aber von 16 bis 21° eine starke Optimumperiode sozusagen superponiert hat. Der Schluß ist berechtigt, daß *am mittleren Optimum Vorgänge einsetzen, die die Lichtausnutzung erhöhen.*

---

[1]) *Willstätter* und *Stoll*, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure 1918.

[2]) *O. Warburg*, diese Zeitschr. **100**, 230, 1919; **103**, 188, 1920; Die Naturwissensch. 1921, S. 1.

[3]) *K. Noack*, Zeitschr. f. Bot. 1920, S. 273.

[4]) *O. Warburg*, diese Zeitschr. **146**, 486, 1924.

Der Temperaturquotient im Optimumgebiet ist weit höher als für einfache chemische Vorgänge, bei $^1/_{25}$ Licht 0,03 Proz. CO_2 für 16 bis 17° $Q_1 = 1{,}80$, bei $^1/_1$ Licht 0,03 Proz. CO_2 $Q_1 = 1{,}16$, während bei der zweifellos „chemischen" Atmung Q_1 = höchstens 1,09[1]). Man könnte an die Bildung eines Enzyms denken, das die Lichtenergieaufnahme seitens des Chlorophylls vermittelt, welche Annahme jedoch aus dem Grunde weniger wahrscheinlich erscheint, weil es ja drei getrennte Optimumgebiete gibt. Eher würde man Veränderungen kolloid-chemischer oder anderer Art vermuten, durch welche eine vollständigere

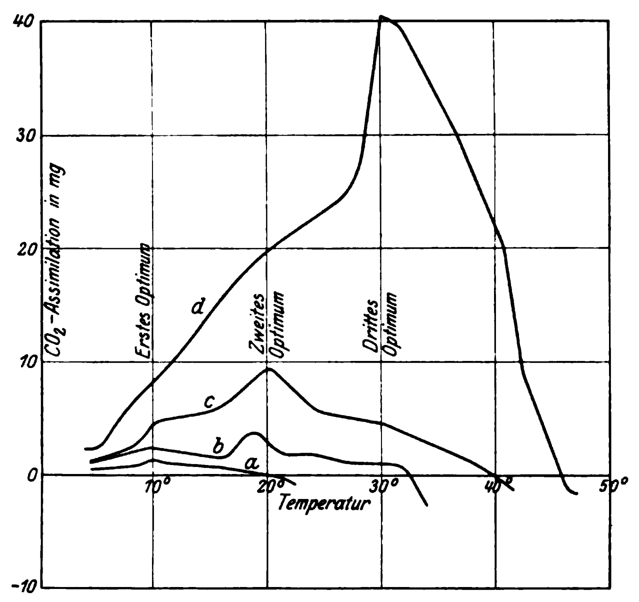


Abb. 11. Schema über die Verschiebung des Optimums bei Kartoffelblättern. *a* = sehr schwachem Licht und niedrigem CO_2-Gehalt (theoretische Kurve). *b* = schwachem Licht und normalem CO_2-Gehalt. *c* = starkem Licht und normalem CO_2-Gehalt. *d* = starkem Licht und hohem CO_2-Gehalt.

Energieausnutzung erzielt wird. Erst eingehende biochemische Untersuchungen können hierüber Entscheidung bringen. Um eine Beschleunigung von Vorgang 4 handelt es sich sicher nicht, weil dann bei schwachem Licht das Optimum verschwinden würde. *Willstätter* hat gefunden, daß *Chlorina*formen pro Einheit Chlorophyll mehr Lichtenergie ausnutzen als grüne Blätter. Er verlegt die Ursache hiervon in eine größere Menge eines „Assimilationsenzyms", das bei dem Vorgang 4 mitwirken soll[2]). Die von *Willstätter* vorgeführten Beobachtungen

[1]) Das hohe Optimum der Kartoffeln zeigt $Q_1 = 1{,}45$, was einem Q_{10} = etwa 40 entspricht. So hohe Q-Werte sind früher nur für die Lebensdauer angegeben worden (s. *Kanitz*, a. a. O. 1915, S. 105ff.).

[2]) *Willstätter* und *Stoll*, a. a. O. 1918, S. 246.

ließen sich wohl ebensogut mit der Annahme vereinigen, daß das „Enzym“ schon im Vorgang 3 sich betätige, also gerade bei dem Prozeß der Energieumwandlung.

In Übereinstimmung mit dem Relativitätsgesetz sinkt die am aufsteigenden Ast der Optimumzone gemessene *relative* Assimilationssteigerung mit steigender Intensität des Licht- und des CO_2-Faktors, wie aus den Q_1-Werten hervorgeht:

Tabelle IX.

CO_2-Assimilation mg	Q_1 am mittleren Optimum	Lichtfaktor	CO_2-Faktor Proz.
3,47 (18°)	1,80	1/25	0,03
9,57 (20°)	1,16	1/1	0,03
18,3 (18,1°)	1,10 [1])	1/1	1,22

Diese Tatsache ist leicht verständlich: Bei immer gesteigerter absoluter Assimilationsleistung wird die „innere Oberfläche“[2]) immer mehr von den reagierenden Komponenten blockiert, weil die Fortleitung der Reaktionsprodukte mit endlicher Geschwindigkeit erfolgt. Namentlich dürfte auch der Transport der Kohlensäure bzw. des primären Kohlensäurederivats von der Zelloberfläche bis zu dem Innern der Chromatophoren (also Vorgang 1 und 2) einen wichtigen regulierenden Faktor darstellen.

Während am mittleren Optimum — und anscheinend auch beim niedrigen Optimum — die Lichtausnutzung direkt gesteigert wird, so scheinen bei dem hohen Optimum andere, nicht direkt vom Lichte abhängige Teilprozesse begünstigt zu werden. Bei niedriger Lichtintensität wird nämlich das dritte Optimum fast völlig verwischt (s. Abb. 10). Es wird also hier entweder die CO_2-Bindung seitens des Chlorophylls oder der Zerfall des Peroxyds begünstigt. Die Tatsache, daß bei Erhöhung des CO_2-Faktors allein das Optimum bedeutend nach rechts verschoben wird (Abb. 9, obere Kurve), spricht mehr für die erste Alternative (also Begünstigung von Vorgang 2). Der sehr hohe Temperaturquotient deutet darauf hin, daß auch beim hohen Optimum enzymatische oder kolloidchemische Prozesse mit beteiligt sind.

Warburg[3]) hat angenommen, daß bei hoher Bestrahlungsintensität und hoher CO_2-Konzentration die Geschwindigkeit der Assimilation im mittleren Temperaturgebiet von einer chemischen Reaktion, der sogenannten *Blackman*schen Reaktion, bestimmt wird. Er stützt

[1]) Aus den Werten bei 17 und 18° berechnet.

[2]) Ich folge hier der Auffassung *O. Warburgs*, nach der Oberflächenreaktionen bei der Energieübertragung tätig sind.

[3]) *O. Warburg*, Die Naturwissenschaften 1921, S. 2.

sich hierbei auf die aus *Matthaeis* Versuchen von *Blackman* berechneten Temperaturquotienten. Diese sind aber, wie *Willstätter*[1]) zeigte, ***nicht zuverlässig.***

Die bei hoher Bestrahlungsintensität und hoher CO_2-Konzentration erzielte Temperaturkurve läßt sich am einfachsten als die Resultierende von einer Serie Prozesse mit hohem Q_t und einer interferierenden Serie Prozesse mit niedrigem Q_t auffassen. Die Prozesse mit hohem Q_t setzen für die Kartoffelblätter bei etwa 7 bis 10°, etwa 16 bis 20°, etwa 27 bis 30° ein. Die Prozesse mit niedrigem Q_t nehmen die Intervalle 10 bis 16°, 20 bis 27° und oberhalb 30° ein.

In der ersten Serie ***sinkt*** Q_t, wie oben aufgezeigt wurde, mit steigender Intensität der äußeren Assimilationsfaktoren.

Auch in der zweiten Serie folgt Q_t dem Relativitätsgesetz.

Im Intervall 10 bis 16° ***steigt*** Q_t mit steigender Lichtintensität und CO_2-Konzentration (Tabelle X).

Tabelle X.

CO_2-Assimilation 13° C mg	Q_t 13—14° C	Lichtfaktor	CO_2-Faktor Proz.
1,80	0,92	1/25	0,03
4,10	1,00	1/25	1,22
5,5	1,04	1/1	0,03
11,5	1,08	1/1	1,22

Das Intervall 10 bis 16° würde also am ehesten den Anforderungen der *Blackman-Warburg*schen Theorie entsprechen, weil hier der „Normalwert" für q_1[2]) bei maximalen Bedingungen erreicht wird.

Abweichend verhält sich das Intervall 20 bis 27°.

Tabelle XI.

CO_2-Assimilation 25° C mg	Q_t 25—26° C	Lichtfaktor	CO_2-Faktor Proz.
1,5	0,80	1/25	0,03
5,5	0,96	1/1	0,03
7,9	0,95	1/25	1,22
23,5	1,03	1/1	1,22

Der „Normalwert" für chemische Reaktionen wird in diesem Intervall niemals erreicht, auch nicht bei Tomaten und Gurken (vgl. Tabellen IV und V), und man begegnet also hier wesentlich anderen Vorgängen als in dem Intervall 10 bis 14°. Man kann die Sache am

[1]) *Willstätter*, a. a. O. 1918, S. 157.

[2]) D. h. der für chemische Reaktionen und für die Atmung geltende Wert q_1 = 1,08 bis 1,10.

einfachsten so auffassen, daß bei 20⁰ ein hemmender Vorgang einsetzt, der den „chemischen“ Q_t nicht aufkommen läßt. Bei Minimumbedingungen dominiert der hemmende Vorgang, er greift also nicht in den photochemischen Vorgang 3 ein, sondern irgendwo in den „dunklen“ Prozessen.

In dem Intervall 30 bis 40^0 finden wir einen noch stärker akzentuierten hemmenden Vorgang. Auch hier steigt Q_1 mit steigenden Bedingungen, ohne jedoch jemals den Wert 1 zu erreichen (Tabelle XII).

Tabelle XII.

CO_2-Assimilation 35^0 C mg	Q_t 35—36^0 C	Lichtfaktor	CO_2-Faktor Proz.
3,23	0,79	$^1/_1$	0,03
4,17	0,82	$^1/_{25}$	1,22
33,5	0,94	$^1/_1$	1,22

Bei etwa 40^0 macht die Kurve einen neuen Knick (übereinstimmend für alle drei Pflanzen, vgl. Abb. 4), es scheint hier also wieder eine neue letzte Reaktionsphase einzusetzen. Bei 40^0 findet man übrigens das erste Atmungsoptimum (Abb. 3).

Die Analyse des Kurvenmaterials hat somit eigenartige, bisher unbekannte Gesetzmäßigkeiten in der Wirkung des Temperaturfaktors zutage gebracht. Da die Temperatur, im Gegensatz zu dem Lichte, nicht als Energiefaktor hineintritt, handelt es sich um Zustandsänderungen im heterogenen protoplasmatischen System, durch welche die relative Geschwindigkeit der Teilprozesse der Assimilation beeinflußt wird. Diese Zustandsänderungen treten bei kontinuierlich steigender Temperatur sprungweise auf.

Für die rein chemischen Teilvorgänge der Assimilation wäre ein Temperaturquotient $q_1 = 1{,}08$ bis 1,10 bzw. $q_{10} = 2$ bis 3 anzunehmen. Auf Grund der vom Temperaturfaktor verursachten sprungweisen Änderungen der inneren Reaktionsbedingungen tritt uns diese Normalkurve nur in sehr verschleierter oder unvollständiger Form vor Augen. Wenn ein fördernder Vorgang einsetzt, steigt Q_t über das „Normale“ einer chemischen Reaktion, wenn ein hemmender Vorgang einsetzt, sinkt Q_t unter das Normale. *Das Optimum*, wie wir es in diesem Aufsatz definieren, *ist der Punkt, wo ein hemmender Vorgang einsetzt.*

Tabelle XIII.

Solanum tuberosum. Atmung in 50-ccm-Küvette. Volumetrische Analyse.

Nr.	Datum	Tageszeit	Temperatur °C	Blattfläche	Atmung pro 50 qcm und 1 Stunde mg	Stomata	Bemerkungen
1	1. IX.	8^{a}45 —10^{a}54	0,5 ± 0,2	41,7 (2)[1]	0,092	1 : 1	
2	1. IX.	11 8 —11 51	8,7 ± 0,7	41,8 (2)	0,279	1 : 1	
3	1. IX.	11 10 —12^{p}15	18,0 ± 0,2	36,5 (2)	0,474	3 : 4	
4	1. IX.	10 15 —11^{a}19	22,8 ± 0,7	22,8 (1)	0,760	1 : 1[2]	
5	1. IX.	12 0 —12^{p}50	27,7 ± 0,3	48,5 (2)	1,037	1 : 4[2]	
6	1. IX.	11 36 —12 8	32,6 ± 1,0	39,2 (2)	1,436	1 : 1	
7	1. IX.	1^{p} 7 — 1 35	34,0 ± 1,0	29,8 (3)	1,487	1 : 1	
8	2. IX.	1 40 — 1 45	37,1 ± 0,1	19,8 (1)	1,844	—	
9	1. IX.	11^{a}31 —12 1	36,5 ± 0,5	27,8 (2)	1,710	1 : 2—1 : 10	
10	1. IX.	2^{p} 0 — 2 5	37,8 ± 0,2	19,8 (1)	1,907	—	Vorerwärmung 20 Minuten
11	1. IX.	10^{a}15 —11^{a}10	38,0 ± 1,0	20,6 (1)	1,291	0 : 1	
12	2. IX.	9 38 — 9 51	39,0 ± 0,3	14,0 (1)	2,638	1 : 1	
13	2. IX.	1^{p}30 — 1^{p}35	40,1 ± 0,1	15,0 (1)	1,566	1 : 1	Vorerwärmung 5 Minuten
14	1. IX.	3 9 — 3 19	40,1 ± 0,2	26,6 (2)	1,409	1 : 1	" 74 "
15	1. IX.	1 12 — 1 44	41,4 ± 0,2	30,8 (2)	1,514	1 : 1	
16	2. IX.	12 30 —12 35	40,2 ± 0,2	28,5 (2)	1,642	1 : 1	Vorerwärmung 240 Minuten
17	2. IX.	2 30 — 2 45	40,1 ± 0,5	16,5 (1)	1,138	1 : 1	" 360 " [3])
18	1. IX.	2 33 — 2 50	40,0 ± 0,5	17,0 (1)	1,534	1 : 1	" 38 "
19	1. IX.	1 0 — 1 26	46,0 ± 1,0	28,0 (2)	1,712	1 : 1	
20	6. X.	8^{a}41$^{1}/_{2}$— 8^{a}51$^{1}/_{2}$	37,0 ± 0,5	46,3 (2)	1,99	1 : 1	
21	6. X.	8 19$^{1}/_{2}$— 8 31	40,8 ± 0,6	43,8 (2)	2,60	1 : 2	
22	5. X.	8 3 — 9 4	42,5 ± 2,0	35,6 (2)	1,00	1 : 1	[3])
23	6. X.	7 49 — 8 1	43,0 ± 0,5	46,8 (2)	2,40	1 : 10	
24	6. X.	9 37 — 9 47	45,2 ± 0,7	35,2 (1)	0,49	1 : 1	Altes Blatt
25	6. X.	7 55 — 8 10	46,0 ± 0,5	32,6 (2)	2,47	1 : 1	
26	6. X.	8 50 — 8 59$^{1}/_{2}$	49,0 ± 0,5	45,2 (2)	3,79	1 : 1	
27	6. X.	8 9 — 8 20$^{1}/_{2}$	49,2 ± 0,5	55,6 (2)	4,92	1 : 1	
28	6. X.	9 41 — 9 48$^{1}/_{2}$	51,5 ± 0,5	37,4 (2)	3,34	1 : 1	[4])
29	6. X.	8 39 — 8 48	54,5 ± 0,5	38,9 (2)	2,73	1 : 1	[5])

[1]) Die eingeklammerten Ziffern geben die Zahl der Blätter an. — [2]) Offen den Nerven entlang. — [3]) Das Blatt deutlich beschädigt (dunkle Punkte). — [4]) Blätter schlaff und tot am Rand. Nicht fleckig. — [5]) Vollkommen schlaff.

Tabelle XIV.

Solanum tuberosum.

Kohlensäurekonzentration: 1,22 Proz. Licht: Volles Sonnen- und Himmelslicht. Volumetrische Analyse. Inhalt der Küvette: 0,61 ccm CO_2.

Nr.	Datum	Tageszeit	Temperatur °C	Blattfläche qcm	Stomata	Assimilation direkt gemessen ccm	Assimilation pro 50 qcm u. 1 Std. mg
1	31. VIII.	11^{a}30	2,2 ± 0,2	18,0	1 : 1	0,0589 in 4 Min.	4,77
2	30. VIII.	11 20	2,5 ± 0,0	20,0	1 : 1	0,048 „ 4 „	3,49
3	30. VIII.	11 35	3,1 ± 0,3	17,0	1 : 1	0,0511 „ 4 „	4,37
4	30. VIII.	12^{p}55	3,7 ± 0,2	15,4	1 : 1	0,0279 „ 4 „	2,62
5	30. VIII.	1 6	5,6 ± 0,4	19,5	1 : 1	0,0356 „ 4 „	2,63
6	31. VIII.	12 30	7,2 ± 0,0	14,4	1 : 1	0,0573 „ 4 „	5,70
7	30. VIII.	11^{a}52	7,0 ± 0,0	16,3	1 : 1	0,0419 „ 3 „	4,88
8	30. VIII.	1^{p}25	10,7 ± 0,6	15,1	1 : 1	0,1007 „ 4 „	9,97
9	31. VIII.	1 40	11,7 ± 0,5	14,4	1 : 1	0,076 „ 3 „	9,93
10	30. VIII.	12 15	12,5 ± 0,2	19,2	1 : 1	0,1039 „ 3 „	10,14
11	22. VIII.	9^{a}00	17,1 ± 0,3	20,0	1 : 1	0,302 „ 5 „	16,7
12	22. VIII.	8 45	18,1 ± 0,3	22,3	3 : 4	0,370 „ 5 „	18,3
13	21. VIII.	11 30	27,2 ± 0,0	16,0	1 : 2	0,380 „ 5 „	25,2
14	23. VIII.	9 30	28,2 ± 0,0	17,4	9 : 10	0,440 „ 5 „	26,9
15	23. VIII.	1^{p}00	30,2 ± 0,0	13,5	1 : 3	0,5217 „ 5 „	40,7
16	21. VIII.	10^{a}00	31,8 ± 0,0	13,2	3 : 4	0,4984 „ 5 „	39,8
17	23. VIII.	9 45	37,0 ± 0,0	15,0	1 : 1	0,260 „ 3 „	29,6
18	22. VIII.	1^{p}00	41,0 ± 0,0	15,8	1 : 1	0,185 „ 3 „	19,7
19	22. VIII.	12 45	42,6 ± 0,0	12,0	1 : 1	0,062 „ 3 „	8,63
20	22. VIII.	1 20	46,8 ± 0,2	13,8	1 : 1	÷ 0,01 „ 3 „	÷ 1,18
21	22. VIII.	1 40	48,5 ± 0,3	13,2	1 : 1	÷ 0,009 „ 3 „	÷ 1,11

Tabelle XV.

Solanum tuberosum.

Kohlensäurekonzentration: 1,22 Proz. Acetylenlicht = etwa $^{1}/_{25}$ des vollen Sonnen- und Himmelslichts. Volumetrische Analyse.

Nr.	Datum	Tageszeit	Temperatur °C	Blattfläche qcm	Assimilation direkt gemessen ccm	Assimilation pro 50 qcm und 1 Stunde mg	Stomata
1	11. IX.	9^{a}00	0,5 ± 0,5	24,0	0,0418	2,06	1 : 1
2	10. IX.	12^{p} 5	4,6 ± 0,3	16,6	0,0325	2,24	1 : 1
3	10. IX.	9^{a}10	10,5 ± 0,5	17,8	0,0883	5,60	1 : 1
4	10. IX.	9 20	12,2 ± 0,2	18,0	0,0651	4,10	1 : 1
5	10. IX.	1^{p}55	15,5 ± 0,0	24,5	0,0899	4,08	1 : 1
6	10. IX.	1 15	19,1 ± 0,1	18,0	0,0837	5,12	1 : 1
7	10. IX.	1 40	25,2 ± 0,2	11,0	0,0852	8,30	1 : 1
8	10. IX.	2 00	30,5 ± 0,1	8,3	0,0496	6,27	1 : 1
9	10. IX.	2 25	34,6 ± 0,1	9,6	0,0387	4,17	1 : 1
10	11. IX.	1 45	38,5 ± 0,5	27,0	0,0418	1,57	2 : 3
11	10. IX.	1 40	42,5 ± 0,5	8,7	÷ 0,0093	— 1,07	1 : 1

Tabelle XVI. Solanum tuberosum.

Kohlensäurekonzentration: Normalgehalt der freien Luft. Volles Sonnen- und Himmelslicht. Titrationsanalyse.

Nr.	Datum	Tageszeit	Temperatur °C	Blattfläche qcm	CO_2-Gehalt der Luft mg pro Liter	Volumen der Luft ccm	Assimilation direkt gemessen mg	Assimilation pro 50 qcm 1 Std. und 0,56 mg CO_2 pro Liter mg
1	4. IX.	8ᵃ30	4,0 ± 0,5	27,0	0,640	1960	0,154 in 15 Min.	1,00
2	4. IX.	2ᵖ25	8,7 ± 0,2	17,2	0,610	2100	0,158 „ 9 „	2,81
3	4. IX.	9ᵃ00	10,8 ± 0,6	21,4	0,640	1750	0,466 „ 10 „	5,77
4	3. IX.	2ᵖ40	11,0 ± 0,5	24,5	0,694	980	0,470 „ 10 „	4,77
5	5. IX.	8ᵃ00	14,8 ± 0,2	18,6	0,789	2170	0,512 „ 10 „	5,86
6	4. IX.	1ᵖ37	17,0 ± 0,5	33,6	0,610	2100	0,785 „ 10 „	7,02
7	6. IX.	9ᵃ17	17,5 ± 0,1	21,4	0,556	2100	0,478 „ 8½ „	7,90
8	6. IX.	8 59	20,0 ± 0,1	21,8	0,556	2100	0,539 „ 7¾ „	9,57
9	4. IX.	9 25	24,4 ± 0,2	14,5	0,640	1960	0,318 „ 10 „	5,77
10	4. IX.	11 35	29,5 ± 0,5	19,5	0,640	1960	0,428 „ 10 „	4,81
11	4. IX.	11 47	34,6 ± 0,0	18,4	0,640	1435	0,198 „ 10 „	2,8
12	5. IX.	10 15	39,2 ± 0,2	16,2	0,790	2060	0,033 „ 10 „	0,43

Tabelle XVII. Solanum tuberosum.

Kohlensäurekonzentration: Normalgehalt der Luft. Acetylenlicht: etwa 1 : 12. Titrationsanalyse.

Nr.	Datum	Tageszeit	Temperatur °C	Blattfläche qcm	CO_2-Gehalt der Luft mg pro Liter	Volumen ccm	Assimilation direkt gemessen mg	Assimilation pro 50 qcm 1 Std. 0,57 mg CO_2 mg	Stomata
1	6. X.	8ᵃ54— 9ᵃ 3	4,7 ± 1,0	23,6	0,570	2100	0,072	1,01	1 : 1
2	6. X.	9 21 — 9 32⅛	11,0 ± 0,4	25,4	0,570	2100	0,472	5,00	1 : 1
3	6. X.	1ᵖ49— 1ᵖ55¾	12,1 ± 0,5	27,6	0,570	2100	0,335	5,40	1 : 1
4	6. X.	12 00—12 9	17,4 ± 0,2	17,7	0,570	2100	0,275	5,18	1 : 1
5	6. X.	12 20—12 29⅙	21,0 ± 0,0	14,0	0,570	2100	0,385	9,02	1 : 1
6	6. X.	12 36—12 47⅓	25,8 ± 0,1	20,8	0,570	2100	0,566	7,92	1 : 1
7	6. X.	3 54— 4 7	35,5 ± 0,5	19,2	0,570	2100	0,429	5,15	1 : 5

Anmerkung: Diese Reihe wurde im Text nicht besonders erwähnt, weil sie etwa einen Monat später als die Versuche in Tabelle XVI ausgeführt [illegible] Lichtintensität wurde nur ungefähr bestimmt und liegt jedenfalls im Maximumgebiet.

Tabelle XVIII.

Solanum tuberosum.

Kohlensäurekonzentration: Normalgehalt der Luft. Acetylenlicht: etwa $^1/_{25}$ des vollen Sonnen- und Himmelslichtes. Titrationsanalyse.

Nr.	Datum	Tageszeit	Temperatur °C	Blattfläche qcm	CO_2-Gehalt der Luft mg pro Liter	Volumen ccm	Assimilation direkt gemessen mg	Assimilation reduziert auf 0,56 mg CO_2-Gehalt mg	Stomata
1	10. IX.	9ᵃ	1,0 ± 0,5	27,0	0,573	1960	0,099 in 12 Min.	0,90	1 : 1
2	10. IX.	10 10	3,9 ± 0,1	27,0	0,573	2100	0,075 „ 9 „	0,91	1 : 1
3	10. IX.	8 35	7,3 ± 0,4	23,8	0,573	2100	0,121 „ $8^3/_4$ „	1,70	1 : 1
4	10. IX.	8 45	8,6 ± 0,5	23,8	0,573	1960	0,187 „ 11 „	2,10	1 : 1
5	10. IX.	9 45	12,6 ± 0,5	24,0	0,573	1960	0,220 „ 15 „	1,80	1 : 1
6	9. IX.	10 00	16,0 ± 0,5	19,6	0,528	2100	0,0915 „ $11^1/_2$ „	1,37	1 : 1
7	9. IX.	1ᵖ 12	16,2 ± 0,6	22,8	0,531	1960	0,121 „ 10 „	1,67	3 : 4
8	9. IX.	8ᵃ 30	18,0 ± 0,1	16,6	0,530	2100	0,1815 „ 10 „	3,47	1 : 1
9	6. IX.	9 50	18,7 ± 0,2	15,2	0,555	2100	0,313 „ 17,5 „	3,42	2 : 3
10	10. IX.	12ᵖ 40	19,8 ± 0,0	18,0	0,573	1960	0,264 „ 16 „	2,50	1 : 1
11	8. IX.	3 15	21,3 ± 0,3	16,3	0,573	1960	0,099 „ 10 „	1,78	1 : 1
12	9. IX.	8ᵃ 50	24,0 ± 0,1	21,3	0,530	1960	0,143 „ $11^1/_2$ „	1,85	1 : 1
13	8. IX.	1ᵖ 15	26,7 ± 0,2	15,4	0,525	1610	0,0495 „ 10 „	1,03	4 : 5
14	9. IX.	2 15	31,0 ± 0,4	21,4	0,530	2100	0,0605 „ $8^3/_4$ „	1,00	1 : 1
15	8. IX.	1 35	32,0 ± 0,0	14,6	0,530	1820	0,0385 „ 10 „	0,84	1 : 2
16	8. IX.	1 55	33,6 ± 0,4	20,6	0,530	1260	÷ 0,1815 „ 10 „	—	1 : 1
17	8. IX.	3 40	40,5 ± 0,5	16,4	0,530	1680	÷ 0,220 „ 15 „	—	1 : 1

Tabelle XIX.

Solanum lycopersicum.

Kohlensäurekonzentration: 1,22 Proz. Licht: Volles Sonnen- und Himmelslicht. Volumetrische Analyse.

Inhalt der Küvette 0,61 ccm CO_2.

Nr.	Datum	Tageszeit	Temperatur	Blattfläche	Stomata	Assimilation	
						direkt gemessen	berechnet für 50 qcm Blattfläche u. 1 Std.
			°C	qcm		ccm	mg
1	31. VIII.	11^{a}30	2,5 ± 0,0	16,2	1 : 1	0,031 in 4 Min.	2,78
2	31. VIII.	12^{p}10	5,7 ± 0,4	13,2	1 : 1	0,0224 „ 4 „	2,33
3	31. VIII.	12 35	8,5 ± 0,5	13,0	1 : 1	0,0232 „ 4 „	5,53
4	31. VIII.	1 8	9,9 ± 0,2	10,8	1 : 1	0,0295 „ 3 „	5,17
5	31. VIII.	2 5	16,5 ± 0,5	13,8	1 : 1	0,065 „ 3 „	8,7
6	25. VIII.	11^{a}15	18,7 ± 0,3	15,0	1 : 1	0,130 „ 4 „	11,4
7	25. VIII.	11 00	19,2 ± 0,3	22,0	1 : 1	0,1999 „ 4 „	12,5
8	25. VIII.	2^{p}30	22,7 ± 0,2	15,2	1 : 1	0,1612 „ 3 „	14,1
9	25. VIII.	1 15	27,1 ± 0,2	17,7	1 : 1	0,2387 „ 4 „	18,0
10	23. VIII.	12 30	29,8 ± 0,1	30,7	1 : 1	0,351 „ 3 „	20,0
11[1])	29. VIII.	2 00	32,9 ± 0,2	17,5	1 : 1	0,2325 „ 3 „	23,0
12	25. VIII.	12 25	34,1 ± 0,0	16,2	1 : 1	0,2387 „ 3 „	25,5
13	23. VIII.	1 5	35,4 ± 0,0	23,0	1 : 1	0,381 „ 3 „	28,5
14[2])	29. VIII.	1 0	35,5 ± 0,0	18,6	1 : 1	0,327 „ 3 „	30,3
15	25. VIII.	11^{a}35	37,0 ± 0,0	20,0	1 : 1	0,3286 „ 3 „	28,0
16	23. VIII.	1^{p}30	39,1 ± 0,0	19,0	1 : 1	0,266 „ 3 „	23,7
17	23. VIII.	1 45	40,1 ± 0,0	19,6	1 : 1	0,252 „ 3 „	21,7
18	23. VIII.	2 20	41,2 ± 0,0	24,7	1 : 1	0,297 „ 3 „	20,2
19	23. VIII.	2 0	43,2 ± 0,1	15,0	1 : 1	0,072 „ 3 „	8,0
20	23. VIII.	1 45	47,5 ± 0,3	25,7	1 : 1	÷ 0,062 „ 3 „	÷ 3,95
21	23. VIII.	2 10	49,2 ± 0,1	22,4	1 : 1	÷ 0,098 „ 3 „	÷ 6,63

[1]) Vorerwärmung in 120 Minuten. — [2]) Vorerwärmung in 60 Minuten.

Tabelle XX. Solanum lycopersicum.

Kohlensäurekonzentration: Normalgehalt der Luft. Volles Sonnen- und Himmelslicht. Titrationsanalyse. Stomata 1 : 1.

Nr.	Datum	Tageszeit	Temperatur °C	Blattfläche qcm	CO_2-Gehalt der Luft mg	Volumen der Luft ccm	Assimilation direkt gemessen mg	Assimilation pro 50 qcm 1 Std. 0,56 mg CO_2 pro Liter mg
1	11. IX.	1p 15	1,2 ± 0,2	17,3	0,610	2100	0,176 in $8^1/_4$ Min.	3,30
2	11. IX.	9a 45	2,2 ± 0,2	24,8	0,612	2100	0,242 „ 8 „	3,25
3	5. IX.	1p 10	4,2 ± 0,3	20,0	0,778	2100	0,318 „ 10 „	3,44
4	6. IX.	11a 10	5,5 ± 0,5	32,5	0,555	2100	0,500 „ 8 „	5,77
5	11. IX.	11 30	6,0 ± 0,0	25,6	0,610	2100	0,555 „ 10 „	5,97
6	6. IX.	11 30	10,0 ± 0,5	27,6	0,555	1960	0,550 „ 10 „	5,98
7	6. IX.	11 55	15,6 ± 0,5	23,0	0,555	1680	0,490 „ 10 „	6,40
8	5. IX.	1p 15	20,0 ± 0,5	19,8	0,597	2100	0,517 „ $8^3/_4$ „	8,42
9	6. IX.	3 10	20,9 ± 0,0	17,4	0,758	2100	0,402 „ 8 „	6,40
10	6. IX.	1 30	25,6 ± 0,5	17,2	0,597	2100	0,368 „ 9 „	6,12
11	5. IX.	12 8	30,4 ± 0,4	22,8	0,780	2170	0,373 „ 9 „	3,92
12	8. IX.	8a 53	34,5 ± 0,5	19,0	0,578	2100	0,280 „ 11 „	3,89
13	5. IX.	11 30	40,0 ± 0,0	21,0	0,758	1680	÷ 0,165 „ 10 „	÷ 2,35

Tabelle XXI. Solanum lycopersicum.

Kohlensäurekonzentration: Normalgehalt der Luft. Acetylenlicht: etwa 1 : 12. Titrationsanalyse. Stomata 1 : 1.

Nr.	Datum	Tageszeit	Temperatur °C	Blattfläche qcm	CO_2-Gehalt der Luft mg pro Liter	Volumen ccm	Assimilation direkt gemessen mg	Assimilation pro 50 qcm 1 Std. 0,56 mg CO_2 mg
1	5. X.	3p 50— 3p $39^1/_6$	7,7 ± 0,5	22,0	0,642	2100	0,220	4,74
2	5. X.	2 52— 3 $2^1/_4$	8,0 ± 0,6	21,4	0,642	2100	0,440	5,16
3	5. X.	2 30— 2 $43^1/_2$	11,0 ± 0,5	22,6	0,642	1960	0,512	4,40
4	5. X.	4 11— 4 $24^3/_4$	13,7 ± 0,5	22,2	0,642	1960	0,390	5,00
5	5. X.	11a 13—11a $23^1/_2$	14,0 ± 0,2	17,3	0,642	2100	0,412	5,28
6	5. X.	3p 55— 4p 10	20,4 ± 0,1	22,6	0,642	2100	0,462	7,35
7	5. X.	12 20—12 $33^3/_4$	25,0 ± 0,5	28,0	0,642	2100	0,506	3,44
8	5. X.	1 16— 1 $25^1/_2$	32,0 ± 0,1	25,0	0,642	2100	—0,071	—0,92

Tabelle XXII. Cucumis sativus.

Kohlensäurekonzentration: 1,22 Proz. Volles Sonnen- und Himmelslicht. Volumetrische Analyse.
Inhalt der Küvette: 0,61 ccm CO_2.

Nr.	Datum	Tageszeit	Temperatur	Blattfläche	Assimilation		Bemerkungen
			°C	qcm	direkt gemessen ccm	pro 50 qcm u. 1 Std mg	
1	3. IX.	9a 17	2,5 ± 0,0	32,0	0,0139 in 4 Min.	0,64	
2	3. IX.	11 18	6,2 ± 0,2	22,5	0,031 „ 4 „	1,99	
3	3. IX.	9 40	7,6 ± 0,0	31,4	0,0325 „ 2,5 „	2,41	
4	3. IX.	10 8	12,8 ± 0,0	26,0	0,0651 „ 2,5 „	5,60	
5	26. VIII.	12p 10	18,7 ± 0,4	40,5	0,2465 „ 3 „	11,2	
6	26. VIII.	12 30	24,4 ± 0,1	36,6	0,3052 „ 3 „	14,9	
7	26. VIII.	2 00	25,0 ± 0,2	36,6	0,317 „ 3 „	15,5	
8	26. VIII.	1 20	28,9 ± 0,1	24,0	0,2279 „ 3 „	16,7	
9	28. VIII.	1 53	32,3 ± 0,1	28,8	0,1813 „ 2 „	17,0	Vorerwärmung 5 Minuten
10	27. VIII.	2 45	32,3 ± 0,2	31,2	0,245 „ 2 „	20,5	„ 60 „
11	26. VIII.	12 45	32,9 ± 0,1	29,0	0,296 „ 3 „	17,8	
12	26. VIII.	1 05	32,9 ± 0,0	34,6	0,4278 „ 3 „	21,5	
13	27. VIII.	12 7	33,3 ± 0,0	32,0	0,3115 „ 2,5 „	20,2	
14	28. VIII.	1 40	34,4 ± 0,1	28,4	0,214 „ 2 „	19,6	
15	27. VIII.	9a 20	35,4 ± 0,0	39,0	0,406 „ 2,5 „	21,5	
16	27. VIII.	9 10	35,6 ± 0,0	47,0	0,4525 „ 2,5 „	19,8	
17	27. VIII.	1p 30	35,7 ± 0,2	34,4	0,418 „ 2,5 „	25,0	Vorerwärmung 10 Minuten
18	26. VIII.	2 30	36,1 ± 0,1	26,4	0,3844 „ 2,5 „	29,9	
19	28. VIII.	1 30	37,0 ± 0,0	34,3	0,2805 „ 2 „	20,9	
20	27. VIII.	1 40	37,0 ± 0,2	29,5	0,263 „ 2,5 „	18,3	Vorerwärmung 15 Minuten
21	28. VIII.	9a 50	38,6 ± 0,0	20,0	0,170 „ 2 „	21,6	„ 35 „
22	27. VIII.	11 35	38,4 ± 0,0	31,6	0,411 „ 2,5 „	26,4	
23	28. VIII.	9 30	38,2 ± 0,2	28,7	0,262 „ 2 „	23,3	Vorerwärmung 15 Minuten
24	28. VIII.	10 12	38,3 ± 0,0	18,6	0,1457 „ 2 „	19,9	„ 60 „
25	26. VIII.	10 30	38,9 ± 0,4	37,6	0,4355 „ 3 „	19,6	
26	27. VIII.	12p 00	40,0 ± 0,0	33,0	0,315 „ 2,5 „	19,3	
27	28. VIII.	1 20	40,1 ± 0,1	27,4	0,1984 „ 2 „	18,3	
28	27. VIII.	10a 10	42,2 ± 0,0	38,5	0,4061 „ 2,5 „	21,1	
29	28. VIII.	1p 10	43,0 ± 0,1	32,4	0,220 „ 2 „	16,9	
30	28. VIII.	11a 40	43,0 ± 0,5	27,5	0,115 „ 2 „	10,5	Vorerwärmung 30 Minuten
31	28. VIII.	12p 7	43,0 ± 0,5	26,3	0,0775 „ 2 „	7,38	„ 58 „
32	28. VIII.	12 50	43,0 ± 0,5	24,1	0,0775 „ 2 „	8,00	„ 130 „
33	27. VIII.	9a 00	47,2 ± 0,1	20,0	0,034 „ 2,5 „	2,54	

Studien über die Kinetik der Zymasegärung.

Von

P. Boysen Jensen.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium der Universität Kopenhagen.)

(Eingegangen am 6. November 1924.)

(Mit 14 Abbildungen im Text.)

Der erste Schritt zu einer näheren Analyse der zellfreien Gärung wurde 1905 von *Harden* und *Young*[1]) gemacht, indem diese Forscher zeigen konnten, daß die Zersetzung des Zuckers im Hefepreßsaft von zwei verschiedenen Stoffen, der thermolabilen Zymase und dem thermostabilen Coenzym bedingt ist. Ferner konnten die genannten Forscher zeigen[2]), daß anorganische Phosphate nicht nur, was man schon früher beobachtet hatte, auf die Zuckerzersetzung stimulierend wirken, sondern daß sie als eine notwendige Bedingung der Zuckerzersetzung aufzufassen sind. Fügt man zu einem gärenden Preßsaft, der Zucker im Überschuß enthält, eine Lösung von Alkaliphosphat, so wird die Kohlensäureentwicklung sehr stark beschleunigt, und gleichzeitig wird das freie Phosphat in organische Bindung übergeführt, indem Hexosephosphat gebildet wird. Der Vorgang läßt sich nach *Harden* und *Young* durch die Gleichung

$$2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,PO_4HR_2 = 2\,CO_2 + 2\,C_2H_6O + 2\,H_2O + 2\,C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2$$

darstellen.

Es kommt somit die Zuckerzersetzung während der Phosphatbindung durch ein Zusammenspiel von mindestens vier verschiedenen Komponenten zustande, nämlich 1. die eigentliche „Zymase“ (die ziemlich sicher einen Enzymkomplex darstellt), 2. Coenzym, 3. freies Phosphat und 4. Zucker. Wie später dargelegt wird, sind noch mehrere Komponenten notwendig.

---

[1]) *A. Harden* und *W. J. Young*, Journ. of Physiol. **82**, 1905.

[2]) *Dieselben*, Proc. Roy. Soc. **82**, 321, 1910.

Es entsteht dann die Frage, wie das Zusammenspiel zwischen diesen verschiedenen Komponenten verläuft, oder mit anderen Worten, wie die Geschwindigkeit der Zuckerzersetzung von der Konzentration der einzelnen dieser Komponenten bedingt ist. Schon aus den Untersuchungen von *Harden* und *Young* lassen sich verschiedene Schlüsse, die Kinetik der zellfreien Gärung betreffend, ziehen; eingehender ist die Frage später namentlich von *Meyerhof* und *Euler* behandelt worden. Die Ergebnisse ihrer Untersuchungen werde ich parallel mit der Besprechung meiner eigenen Untersuchungen erwähnen.

I. Methodisches.

1. *Die Darstellung der verschiedenen Gärungskomponenten.*

a) Zymase. Als Ausgangspunkt für die Darstellung von Zymase wurde ursprünglich untergärige Bierhefe, die von den Carlsbergbrauereien zur Verfügung gestellt wurde, benutzt. Später habe ich meistens obergärige Bierhefe (von den vereinigten Brauereien) verwendet. Die Hefe wurde nach *Lebedew* bei etwa 35° getrocknet. Die Darstellung von guter Trockenhefe scheint am sichersten bei Benutzung von untergäriger Bierhefe zu gelingen. Dagegen hat die von obergäriger Bierhefe dargestellte Trockenhefe den Vorteil, daß sie oft ziemlich arm an Coenzym ist, was von großer Bedeutung ist, wenn man coenzymfreie Zymase darstellen will. Der Mazerationssaft (wie gewöhnlich durch Extrahieren der getrockneten Hefe mit 3 Tln. Wasser bei 35 bis 40° in 2 Stunden dargestellt) wurde in Kollodiumhülsen [nach der von *S. P. L. Sörensen* beschriebenen Methode[1]) dargestellt] dialysiert, um das Coenzym zu entfernen. Die Dialyse muß so schnell wie möglich beendet werden und darf bei 0 bis 5° 24 Stunden nicht überschreiten. Um die Geschwindigkeit der Dialyse zu steigern, wurde sowohl die Außen- wie die Innenflüssigkeit mit Hilfe des in Abb. 1 dargestellten Apparates in Bewegung gehalten. Durch die Schläuche *a* und *b* wurde strömendes, destilliertes Wasser (10 Liter pro 20 Stunden) geleitet. Die in der Kollodiumhülse befindliche Flüssigkeit wurde mit einem flachen Gummiband, das durch einen von einem Uhrwerk getriebenen Rührer in Bewegung gehalten wurde, umgerührt. Durch diese Vorrichtung war es bei coenzymarmen Mazerationssäften (und nur solche wurden benutzt) möglich, die Hauptmenge des Coenzyms durch 24stündige Dialyse zu entfernen.

a b

Abb. 1.

---

[1]) *S. P. L. Sörensen* und *Margr. Höyrup*, C. r. d. trav. du labor. Carlsberg **12**, 28, 1916.

Der dialysierte Mazerationssaft wurde mit 8 Tln. 96proz. Alkohol und 4 Tln. Äther[1]) gefällt; der Niederschlag wurde abgenutscht, mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen und nachher im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. In dem getrockneten und gepulverten Präparat (in dem folgenden als „Zymase" bezeichnet) wird der Coenzymgehalt in folgender Weise ermittelt: Es wird eine Mischung von 0,5 g Zymase + 0,5 g Dextrose + $\frac{1}{2}$ mg mol. Hexosephosphat (in 5 ccm Wasser gelöst) + 2 ccm mol./7 sekundäre Kaliumphosphatlösung + 3 ccm 1proz. Acetaldehydlösung dargestellt und die bei 25° in 10 Minuten entwickelte Kohlensäure bestimmt. Dieselbe darf höchstens 1 mg betragen. Der Gehalt der Zymase an freiem Phosphat wurde durch Extraktion mit heißem Wasser und Fällung des Filtrats mit Magnesiamischung bestimmt. 1 g Zymase enthielt oft nur Spuren, höchstens 30 bis 40 mg PO_4.

b) Coenzym (gleich Kochsaft). Abgepreßte obergärige Bierhefe wird mit dem halben Gewicht Wasser versetzt. Nach 24 Stunden wurde das Ganze auf 60 bis 70° erhitzt und nach Abkühlung filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum bei 50 bis 60° zu Sirup eingeengt und in diesem eingeengten Kochsaft, in dem folgenden als „Coenzym" bezeichnet, der Gehalt an freiem Phosphat in üblicher Weise ermittelt. 1 g „Coenzym" enthielt etwa 70 bis 80 mg PO_4.

c) Hexosephosphat, das, wie auch *Meyerhof* gezeigt hat, von entscheidender Bedeutung bei der alkoholischen Gärung ist, wurde durch Zusatz von Phosphat zu gärendem Mazerationssaft nach *Harden* und *Young* dargestellt und über das Bariumsalz, das leichter in kaltem als warmem Wasser löslich ist, gereinigt. Aus dem Bariumsalz wurde das Kaliumsalz durch Umsetzung von 1,22 g Bariumhexosephosphat mit 0,70 g Kaliumsulfat unter Zusatz von 10 ccm Wasser dargestellt; 5 ccm der filtrierten Lösung enthalten dann 1 mg Molekel, die Lösung ist somit $^1/_5$ mol.

d) Phosphatlösungen. Durch Mischung von 6 n KOH-Lösung und 2 mol. H_3PO_4-Lösung wurden primäres und sekundäres Kaliumphosphat in molaren Lösungen dargestellt. Bei den Versuchen wurden meistens Mischungen der beiden letztgenannten Lösungen verwendet. Das Mischungsverhältnis wird nach der von *S. P. L. Sörensen* eingeführten Schreibweise angegeben. So bedeutet 10 ccm mol./7 sekundäre Kaliumphosphatlösung eine Mischung von 3 ccm mol. primäres Kaliumphosphat und 7 ccm mol. sekundäre Kaliumphosphatlösung.

Es wurden ferner bei den Versuchen *e) Dextrose* und *f) Acetaldehyd*, beide in reinster Form, verwendet.

---

[1]) Vgl. *E. Buchner, H. Buchner* und *M. Hahn*, Die Zymasegärung 1903, S. 227.

2. Die Bestimmung der Kohlensäurebildung.

Bei kinetischen Studien über die alkoholische Gärung im Mazerationssaft ist es, wie oben erwähnt, notwendig, die Kohlensäureausscheidung in kurzen Intervallen bestimmen zu können. Dies läßt sich, wie *Harden, Thompson* und *Young*[1]) gezeigt haben, durch volumetrische Messung der Kohlensäure nach Sättigung der gärenden Flüssigkeit mit Kohlensäure erreichen. Die Messung der Kohlensäure geschah mit *Knops* Azotometer. Im inneren Behälter der Entwicklungsflasche des Azotometers wurde gewöhnlich Zucker + Hexosephosphat + Phosphat + ein Teil des Wassers angebracht, in dem äußeren Behälter dagegen Zymase + Coenzym + der restierende Teil des Wassers. Nachdem die mit Kohlensäure gefüllte Entwicklungsflasche die Temperatur des thermoregulierten Wasserbades erreicht hatte, wurden die beiden Flüssigkeitsanteile durch Neigung der Entwicklungsflasche miteinander vermischt, und der Versuch konnte beginnen. Die entwickelte Kohlensäure wurde über mit Kohlensäure gesättigtem Wasser aufgesammelt und gemessen. Die Messungen wurden mit einem Zwischenraum von 5 bis 10 Minuten unternommen. Vor jeder Messung muß die Flüssigkeit in der Entwicklungsflasche kräftig geschüttelt werden, um eine Übersättigung mit Kohlensäure zu vermeiden. Die entwickelte Kohlensäure wird in Milligramme umgerechnet.

3. Regulierung und Messung der Temperatur und der Wasserstoffionenkonzentration.

Die Entwicklungsflasche mit der gärenden Flüssigkeit wurde in einem nach *Krogh*[2]) thermoregulierten Wasserbade, das durch einen Luftstrom umgerührt wurde, angebracht. Alle Messungen sind bei 25° ausgeführt. Die Temperaturschwankungen betrugen höchstens 0,1 bis 0,2°.

Sowohl die Messung als auch die Konstanthaltung der Wasserstoffionenkonzentration war mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Anfangs suchte ich die Wasserstoffionenkonzentration in den mit Kohlensäure gesättigten Flüssigkeiten in der Weise zu bestimmen, daß ich den p_H-Wert der gärenden Flüssigkeit nach der elektrometrischen Methode im Wasserstoffstrom (also in kohlensäurefreier Lösung) ermittelte und die in dieser Weise gefundene Zahl für Kohlensäuresättigung korrigierte. Die Größe dieser Korrektur wurde bestimmt, indem ich Salzlösungen von derselben Zusammensetzung wie die der Versuchslösungen herstellte und mit Hilfe von Indikatoren die Ver-

---

[1]) *A. Harden, J. Thompson* und *W. J. Young*, Biochem. Journ. **5**, 230, 1910.

[2]) *A. Krogh*, Zeitschr. f. biol. Techn. u. Method. **3**, 262, 1913.

schiebung der p_H-Werte durch Sättigung mit Kohlensäure bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen ermittelte. Die Werte dieser Korrekturen sind in Tabelle I wiedergegeben.

Später wurde die Wasserstoffionenkonzentration elektrometrisch bestimmt, und zwar bei Verwendung einer Luftmischung von etwa

Tabelle I.

Verschiebung der p_H-Werte in $^1/_5$ mol. Phosphatlösungen von verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen bei Sättigung mit Kohlensäure bei 25°. (Die Werte wurden mit Hilfe der *Clark*schen Indikatoren bestimmt.)

p_H-Wert der kohlensäurefreien Lösung	p_H-Wert der mit Kohlensäure gesättigten Lösung	Korrektur
7,0	6,4	—0,6
6,5	6,0	—0,5
6,0	5,6	—0,4
5,5	5,2	—0,3
5,0	4,7	—0,3

10 Proz. Wasserstoff und 90 Proz. Kohlensäure statt reinen Wasserstoffs. Das in dieser Weise gefundene Potential wurde auf Wasserstoff von Atmosphärendruck umgerechnet[1]), und der hieraus berechnete p_H-Wert gibt den wahren p_H-Wert der mit Kohlensäure gesättigten Flüssigkeiten ziemlich genau wieder.

Während der Gärung findet trotz des ziemlich großen Gehalts an freiem Phosphat eine nicht unbeträchtliche Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration statt, die wohl unzweifelhaft mit der Überführung des anorganischen Phosphats in organische Bindung zusammenhängt. Der p_H-Wert kann dabei um 0,2 und vielleicht noch mehr verschoben werden. Die unten angegebenen p_H-Werte wurden am häufigsten am Schlusse der Versuche bestimmt.

4. Alle Versuche sind ohne Zusatz von Antiseptika ausgeführt. Es zeigte sich nämlich bald, daß, während ein Zusatz von Toluol zu gärendem Mazerationssaft die Gärungsgeschwindigkeit nicht verändert, dagegen ein Zusatz von Toluol zu Mazerationssaft, bevor die Gärung begonnen hat, bewirken kann, daß die Gärung überhaupt nicht eintritt. Das geht z. B. aus dem folgenden Versuch hervor.

Ähnliche Versuche wurden angestellt mit demselben Ergebnis. Ein Zusatz von Toluol ist auch bei kurzdauernden Versuchen ganz überflüssig. Mehrmals habe ich versucht, nicht gärfähige Mischungen von Mazerationssaft, Dextrose und Phosphat in 24 Stunden bei 25° stehen zu lassen, ohne daß dabei eine CO_2-Ausscheidung beobachtet werden konnte.

[1]) Wegen der benutzten Formeln vgl. z. B. *L. Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration, S. 164, 1914.

Tabelle II.

10 ccm dialysierter Mazerationssaft + 5 ccm Coenzymlösung + 5 ccm 20 proz. Dextroselösung + 5 ccm $^1/_5$ mol. Dikaliumphosphatlösung		10 ccm dialysierter Mazerationssaft + dieselben Zusätze wie in dem beistehenden Versuch + 1 Proz. Toluol.
Zeit	Entwickelte CO_2-Menge in mg pro 5 Minuten	
12h00'		In 4 Stunden wurden nur 0,36 mg CO_2 entwickelt
12 10	3,1	
12 15	3,4	
12 20	3,9	
12 30	4,9	
12 40	6,2	
12 50	7,1	
1 00	11,6	
1 10	9,3	
1 20	9,5	

II. Die Aktivierungszeit und ihre Analyse.

Wie schon oben bemerkt wurde, sind für das Zustandekommen einer alkoholischen Gärung im Mazerationssaft mindestens vier verschiedene Faktoren nötig: 1. die eigentliche „Zymase", 2. Coenzym, 3. Zucker und 4. Phosphat. Wenn man nun diese vier verschiedenen Komponenten in wässeriger Lösung zusammenbringt oder wenn man, was ganz dasselbe ist, zu einem Mazerationssaft, der Zymase, Coenzym und anorganisches Phosphat enthält, Zucker gibt, könnte man glauben, daß Zuckerzersetzung und Kohlensäureausscheidung sofort anfangen wollte. Das ist aber keineswegs der Fall. Es gibt, wie erst *Lebedew* beobachtet hat, eine kürzere oder längere Induktionszeit, in welcher eine CO_2-Entwicklung überhaupt nicht stattfindet.

Nach Ablauf der Induktionszeit beginnt die CO_2-Ausscheidung und nimmt allmählich zu bis zum Erreichen eines Maximalwertes, der sich in einer kürzeren oder längeren Zeit ungefähr konstant erhält. Später, wenn alles freie Phosphat verestert ist, sinkt die CO_2-Ausscheidung wieder zu einem konstanten Wert. Die Gärungsgeschwindigkeit während dieser zweiten Phase der Zymasegärung ist durch die Geschwindigkeit bestimmt, mit der das gebildete Hexosephosphat von der Hexosephosphatase gespalten wird. Der Verlauf der CO_2-Ausscheidung während der Phosphatveresterung ist schematisch in Abb. 2 dargestellt.

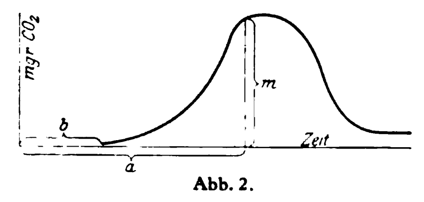


Abb. 2.

Über die Induktionszeit hat *Meyerhof* eingehende Untersuchungen veröffentlicht, auf die ich später zurückkomme. Er definiert als Induktionszeit die Zeit, die vor dem Eintritt der Kohlensäureentwicklung

verstreicht (die Zeit *b* in Abb. 2). Es tritt nun die CO_2-Ausscheidung oft ziemlich allmählich ein, und die Länge der Induktionszeit läßt sich daher nicht immer genau ermitteln. Ich habe daher vorgezogen, die Zeit, die bis zum Erreichen der maximalen Gärgeschwindigkeit verstreicht, zu messen, und um Verwechslungen zu vermeiden, bezeichne ich diese Zeit als Aktivierungszeit (Zeit *a* in Abb. 2).

Wie man sich leicht vorstellen kann, wirkt diese Aktivierungszeit störend bei reaktionskinetischen Messungen. Um nämlich die Reaktionsgeschwindigkeit für eine gegebene Mischung der Gärungskomponenten zu messen, bestimme ich die maximale CO_2-Menge, die von der gegebenen Mischung pro 5 oder 10 Minuten abgegeben wird (*m* in Abb. 2). Diese Bestimmung wird durch die Existenz der Aktivierungszeit erschwert, indem die maximale CO_2-Menge von der Länge der Aktivierungszeit beeinflußt wird. Zum Beginn mußte ich daher untersuchen, wodurch diese Aktivierungszeit bedingt ist und wie man sie, soweit wie möglich, eliminieren konnte.

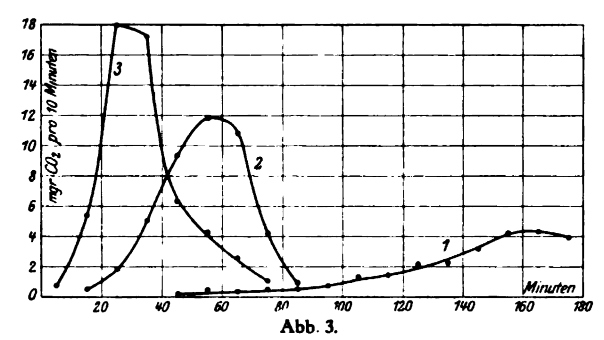


Abb. 3.

Gärungsgeschwindigkeit für verschiedene Konzentrationen von Mazerationssaft bei Anwesenheit einer konstanten Menge von freiem Phosphat. Die Zahlen auf der Ordinatenachse bedeuten die pro 10 Minuten entwickelte Kohlensäuremenge in Milligramm, die Zahlen auf der Abszissenachse die Zeit in Minuten. Die Zusammensetzung der Gärungsflüssigkeiten war die folgende: Kurve 1: 1 ccm Mazerationssaft + 1 g Dextrose + 0,73 ccm mol. Phosphatlösung + 8,25 ccm Wasser. Kurve 2: 2 ccm Mazerationssaft + 1 g Dextrose + 0,5 ccm mol. Phosphatlösung + 7,5 ccm Wasser. Kurve 3: 4 ccm Mazerationssaft + 1 g Dextrose + 6 ccm Wasser. $p_H = 6{,}2$.

Die Existenz der Aktivierungszeit geht aus vielen in der Literatur angeführten Versuchen hervor. Zur Illustration möchte ich aus meinen eigenen Untersuchungen den in Abb. 3 wiedergegebenen Versuch vorführen.

Ein Blick auf Abb. 3 zeigt, daß der aufsteigende Teil der Kurven einer autokatalytischen Kurve durchaus ähnlich ist. Die in jedem Augenblick entwickelte Kohlensäuremenge ist ungefähr der vorher entwickelten Kohlensäuremenge proportional. Nachdem die Kurven einen Maximumwert erreicht haben, fallen sie wieder ab, indem das freie Phosphat nach und nach gebunden wird. Ein Vergleich zwischen den verschiedenen Kurven zeigt, daß die Länge der Aktivierungszeit

sehr variabel ist. Im allgemeinen werden (wie *Meyerhof*, die Induktionszeit betreffend, gesagt hat) die Faktoren, die eine hohe Gärungsgeschwindigkeit bedingen, auch die Aktivierungszeit verkürzen und umgekehrt.

Nun haben *Harden* und *Young* gezeigt, daß Zusatz von Phosphaten eine Verzögerung des Gärungseintritts hervorrufen, und man könnte daher glauben, daß die Aktivierungszeiten bei den in Abb. 3 wiedergegebenen Kurven durch die in den gärenden Flüssigkeiten vorhandenen Phosphate bedingt wurden. Das ist aber jedenfalls nur teilweise der Fall. Setzt man nämlich zu einer gärenden Flüssigkeit, in welcher eine Phosphatveresterung schon einmal stattgefunden hat, eine neue Phosphatmenge gleich der ursprünglichen, so findet selbstverständlich aufs neue eine Phosphatveresterung und eine entsprechende Kohlensäureentwicklung statt, aber diesmal ist die Aktivierungszeit viel kürzer als die ursprüngliche. Das geht z. B. aus Abb. 4 hervor, wo eine primäre und eine sekundäre Phosphatkurve dargestellt ist. Im ersten Falle ist die Aktivierungszeit etwa 60 Minuten, im zweiten nur 10 bis 20 Minuten.

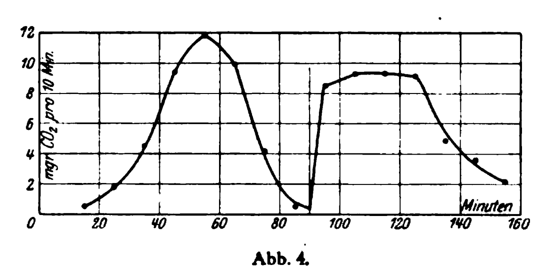


Abb. 4.

Eine primäre und eine sekundäre Phosphatkurve. Die Gärungsflüssigkeit enthielt 2 ccm Mazerationssaft + 0,5 ccm mol. Phophatlösung + 1 g Dextrose + 7,5 ccm Wasser. 90 Minuten nach Beginn des Versuchs, da alles freie Phosphat gebunden war, wurde 1 ccm mol. Phosphatlösung mit demselben p_H-Wert wie die Gärungsflüssigkeit zugesetzt, so daß der Phosphatgehalt wieder derselbe war wie der ursprüngliche.

Man kann aus diesem Versuch schließen, daß die Aktivierungszeit nicht ausschließlich durch die gelösten Phosphate bedingt ist, und es bleibt daher wohl nur die Annahme übrig, daß die Aktivierungszeit entweder durch Überführung einer oder mehrerer der Gärungsstoffe in eine aktive Form oder durch Fehlen gewisser Stoffe, die während der Gärung gebildet werden, verursacht wird. Die letzte Annahme würde mit der autokatalytischen Form der Phosphatkurven stimmen, und wir werden sehen, daß man tatsächlich die Aktivierungszeit durch Zusatz gewisser Stoffe bedeutend verkürzen kann.

Bei der Analyse der Aktivierungszeit beginnen wir mit dem einfachsten Falle und untersuchen

1. Die Aktivierungszeit bei Benutzung von Mazerationssaft.

Meyerhof[1]) hat die schöne Entdeckung gemacht, daß ein Zusatz von Hexosephosphat zu einem mit Zucker versetzten Mazerationssaft, der Zymase, Coenzym und anorganisches Phosphat enthält, bewirkt, daß die Kohlensäureausscheidung sofort beginnt und daß die maximale Kohlensäureausscheidung schneller erreicht wird als ohne diesen Zusatz.

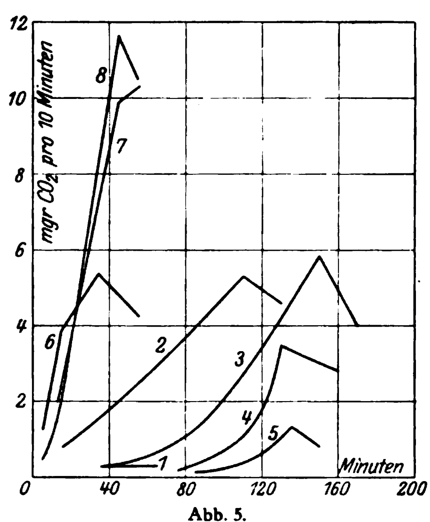


Abb. 5.

Versuche über Zuckervergärung im Mazerationssaft ohne oder mit Zusatz von Hexosephosphat. In den Kurven 1 bis 5 ist die Kohlensäureausscheidung ohne Hexosephosphat bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen dargestellt. Benutzt wurden in allen diesen Versuchen 10 ccm Mazerationssaft + 2 ccm mol. Dextroselösung. Ferner wurde zugesetzt in Versuch 1: 1 ccm mol. H_3PO_4-Lösung (starker Niederschlag), $p_H = 3{,}9$ bis 4,2 (vor und nach dem Versuch gemessen); in Versuch 2: 0,5 ccm mol. H_3PO_4-Lösung + 0,5 ccm mol. KH_2PO_4-Lösung, $p_H = 5{,}1$ bis 5,1; in Versuch 3: 1 ccm KH_2PO_4-Lösung, $p_H = 5{,}5$ bis 5,2; in Versuch 4: 0,5 ccm mol. KH_2PO_4-Lösung + 0,5 ccm mol. K_2HPO_4-Lösung, $p_H = 6{,}0$ bis 5,8; in Versuch 5: 1 ccm mol. K_2HPO_4-Lösung, $p_H = ?$ bis 6,0. In den Kurven 6 bis 8 ist die Kohlensäureausscheidung bei Zusatz von Hexosephosphat dargestellt. Benutzt wurden in diesen Versuchen 10 ccm Mazerationssaft + 2 ccm mol. Dextroselösung + 2 ccm $^1/_5$ mol. Kaliumhexosephosphatlösung. Ferner wurden zugesetzt in Versuch 6: 0,5 mol. H_3PO_4-Lösung + 0,5 mol. KH_2PO_4-Lösung, $p_H = 5{,}4$ bis 5,4; in Versuch 7: 1 ccm mol. KH_2PO_4-Lösung, $p_H = 5{,}8$ bis 5,6; in Versuch 8: 1 ccm mol. K_2HPO_4-Lösung, $p_H = 5{,}9$ bis 5,6.

Es wird also sowohl die Induktionszeit wie die Aktivierungszeit bedeutend verkürzt. Diese Angaben kann ich vollkommen bestätigen. Zwei Versuchsreihen, die ich über diese Frage angestellt habe, sind in Abb. 5 wiedergegeben.

Die Kurven 1 bis 5 in Abb. 5 sind Gärungskurven bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen ohne Zusatz von Hexosephosphat. Die Aktivierungszeit beträgt, wie aus den Kurven hervorgeht, 110

[1]) *O. Meyerhof*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **102**, 185, 1918; vgl. auch *H. Euler* und *K. Myrbäck*, ebendaselbst **133**, 264, 1924.

bis 150 Minuten. Die maximale, pro 10 Minuten abgegebene CO_2-Menge wird von der Wasserstoffionenkonzentration stark beeinflußt. Bei einem p_H-Wert von 4,2 ist die CO_2-Abgabe minimal, bei 5,1 ist die Aktivierungszeit am kürzesten, um bei höheren p_H-Werten zu steigen. Gleichzeitig nimmt die maximale Gärgeschwindigkeit ab. Bei $p_H = 6,7$ findet überhaupt keine CO_2-Entwicklung statt. Ferner beobachtet man, daß die CO_2-Ausscheidung bei $p_H = 5,1$ sofort einsetzt, während bei den höheren p_H-Werten eine ausgesprochene Induktionszeit vorhanden ist.

Die Kurven 6 bis 8 in Abb. 5 sind Gärungskurven bei Zusatz von Hexosephosphat. Die Aktivierungszeit beträgt hier nur etwa

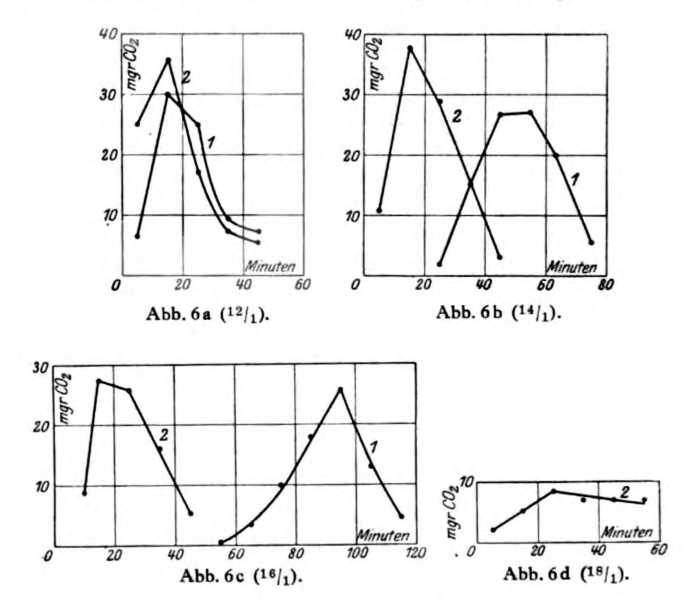


Abb. 6a ($^{12}/_{1}$). Abb. 6b ($^{14}/_{1}$).

Abb. 6c ($^{16}/_{1}$). Abb. 6d ($^{18}/_{1}$).

40 Minuten, ist also ganz bedeutend verkürzt. Die Länge der Aktivierungszeit wird innerhalb der untersuchten Grenzen von der Wasserstoffionenkonzentration ziemlich wenig beeinflußt. Die pro 10 Minuten abgegebene CO_2-Menge ist aber bei $p_H = 5,8$ ungefähr doppelt so groß wie bei $p_H = 5,4$.

Wir können aus diesen Versuchen schließen, daß, wie erst *Meyerhof* gefunden hat, die Aktivierungszeit durch Zusatz von Hexosephosphat ganz bedeutend verkürzt wird, und daß die Existenz der Aktivierungszeit jedenfalls teilweise dadurch erklärt wird, daß frisch hergestellter Mazerationssaft nur Spuren von Hexosephosphat enthält, nach und nach, wenn durch die Phosphatbindung neues Hexosephosphat gebildet wird, steigt auch die Geschwindigkeit der CO_2-Ausscheidung bis zum

Erreichen eines Maximalwertes. Die autokatalytische Form der Gärungskurve ist also jedenfalls teilweise dadurch bedingt, daß das während der Gärung gebildete Hexosephosphat die Geschwindigkeit der Phosphatbindung beeinflußt.

Ferner läßt sich zeigen, daß das Hexosephosphat nicht nur die Geschwindigkeit der Phosphatbindung beeinflußt, sondern daß es auch für die *Phosphatbindung notwendig* ist. Um dies beweisen zu können, ist es notwendig, hexosephosphatfreie Lösungen von Zymase und Coenzym herzustellen. Das läßt sich erreichen, indem man eine Lösung von Zymase und Coenzym einige Zeit stehen läßt. Das Hexosephosphat, das bei dem Beginn des Versuchs in der Lösung vorhanden sein könnte, wird dann nach und nach verschwinden, indem die Hexose nach vorhergehender Spaltung des Hexosephosphats vergoren wird. Wenn alles Hexosephosphat verschwunden ist, tritt nach Zusatz von Zucker + Hexosephosphat eine CO_2-Ausscheidung ein, ohne Hexosephosphat dagegen nicht.

Abb. 6 stellt eine solche Versuchsreihe dar. Eine Lösung von 80 ccm Mazerationssaft + 3 g eingedampften Kochsafts + 0,8 g Rohrzucker + 5 ccm mol./5 sekundärer Kaliumphosphatlösung wurden bei 25° hingestellt, bis der Rohrzucker teils vergoren, teils in Hexosephosphat übergeführt worden war. Die Lösung wurde dann bei niedriger Temperatur hingestellt. Der p_H-Wert der Mischung wurde gemessen, und es wurde eine $^1/_5$ mol. Kaliumhexosephosphatlösung von derselben Wasserstoffionenkonzentration hergestellt. Zu verschiedenen Zeiten wurde dann die Geschwindigkeit der Phosphatbindung in entnommenen Proben der Mischung, teils mit, teils ohne Zusatz von Hexosephosphat, untersucht (zu jedem Versuch wurden benutzt 10 ccm Mazerationssaft + 1 g Rohrzucker + 5 ccm Wasser bzw. 5 ccm mol./5 Kaliumhexosephosphatlösung). 24 Stunden nach dem Beginn des Versuchs (12. Januar) war die Aktivierungszeit in beiden Versuchen ungefähr dieselbe: es finden sich noch in der Lösung bedeutende Mengen Hexosephosphat. Die Aktivierungszeit hält sich in den folgenden Tagen bei Zusatz von Hexosephosphat ungefähr konstant, doch wird die maximale Gärgeschwindigkeit nach und nach kleiner (weil die Zymase destruiert wird?). Noch nach 7 × 24 Stunden (18. Januar) läßt sich eine deutliche CO_2-Ausscheidung bei Zusatz von Hexosephosphat nachweisen. In den Versuchen ohne Zusatz von Hexosephosphat steigt dagegen die Aktivierungszeit von Tag zu Tag; nach 3 × 24 Stunden (14. Januar) ist sie 50 Minuten, nach 5 × 24 Stunden (16. Januar) 100 Minuten und nach 7 × 24 Stunden läßt sich eine CO_2-Ausscheidung ohne Zusatz von Hexosephosphat überhaupt nicht nachweisen, offenbar weil alles Hexosephosphat in der Lösung verschwunden ist.

Mit demselben Rechte, wie man schließt, daß das Coenzym eine notwendige Bedingung für die Zymasegärung ist, kann man aus diesem Versuch schließen, daß auch das Hexosephosphat eine unerläßliche Bedingung ist: In einer Lösung, die ohne Hexosephosphat keine CO_2-Ausscheidung zeigt, kann man durch Zusatz von Hexosephosphat eine CO_2-Ausscheidung hervorrufen.

Die nächste Frage ist dann die: Ist die Aktivierungszeit allein durch Mangel an genügender Menge von Hexosephosphat bedingt, oder spielen noch andere Faktoren mit? *Meyerhof* hat diese Frage dahin beantwortet, daß auch bei Zusatz von Hexosephosphat eine Induktionszeit vorhanden ist. Diese Frage läßt sich am besten durch Verwendung von gefällter Zymase statt Mazerationssaft untersuchen.

2. *Aktivierungszeit bei Verwendung von gefällter Zymase.*

In Abb. 7 stellen die Kurven die Kohlensäureausscheidung während der Phosphatveresterung in einer Mischung von Zymase, Coenzym, anorganischem Phosphat und Zucker bei Zusatz von Hexosephosphat dar. Man sieht, daß selbst bei Gegenwart von Hexosephosphat eine beträchtliche Aktivierungszeit zurückbleibt, die in dem betreffenden Versuch bis 180 Minuten beträgt, häufig aber kürzer ist. Diese Aktivierungszeit wollen wir nun näher untersuchen.

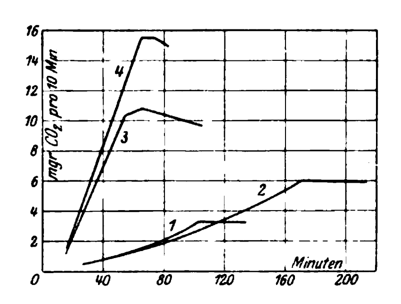


Abb. 7.

Aktivierungszeit in Versuchen mit gefällter Zymase bei Zusatz von Hexosephosphat. Kurve 1 stellt die CO_2-Ausscheidung dar in einer Lösung von 0,25 g Zymase + 0,25 g Coenzym + 5 ccm mol./5 Hexosephosphatlösung + 3 ccm 20 proz. Dextrose + 1,97 ccm mol. Phosphatlösung, Kurve 2 für eine Lösung von 0,25 g Zymase + 0,5 g Coenzym + 5 ccm mol./5 Hexosephosphat + 3 ccm 20 proz. Dextrose + 1,8 ccm mol. Phosphatlösung + 0,2 ccm Wasser, Kurve 3 für eine Lösung von 0,5 g Zymase + 0,25 g Coenzym + 5 ccm mol./5 Hexosephosphatlösung + 3 ccm 20 proz. Dextrose + 1,92 ccm mol. Phosphatlösung und Kurve 4 für eine Lösung von 0,5 g Zymase + 0,5 g Coenzym + 5 ccm mol./5 Hexosephosphatlösung + 3 ccm 20 proz. Dextrose + 1,75 ccm mol. Phosphatlösung + 0,25 ccm Wasser.

Erstens läßt sich dartun, daß der Gäranstieg bei Gegenwart von Hexosephosphat von der Coenzymkonzentration sehr wenig beeinflußt wird, dagegen in hohem Grade von der Zymasekonzentration. Das

geht gleichfalls aus Abb. 7 hervor. Eine Betrachtung der Kurven 1 und 2 bzw. 3 und 4 zeigt, daß der Göranstieg für 0,25 und 0,5 g Coenzym im Anfang ganz derselbe ist und daß die beiden Kurven sich nur durch die Größe der maximalen Gärgeschwindigkeit unterscheiden. Man gewinnt den Eindruck, daß die Zymasegärung außer von den oben genannten Komponenten (Zymase, Coenzym, Hexosephosphat, Zucker und Phosphat) noch von der Gegenwart einer anderen Verbindung, die während der Gärung gebildet wird, abhängig ist.

Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Gärung bei Gegenwart von Hexosephosphat geht aus Abb. 8 hervor. Man sieht, daß die maximale Gärgeschwindigkeit innerhalb der Grenzen $p_H = 5,3$ bis 6,8 mit steigendem p_H-Werte wächst.

Man könnte nun fragen: Ist die Aktivierung bei Gegenwart von Hexosephosphat an eine alkoholische Gärung gebunden oder nicht? Die Versuche haben gezeigt, daß das erstere tatsächlich der Fall ist. Es wurde die Länge der Aktivierungszeit verglichen, teils bei gleichzeitiger Mischung aller Gärungskomponenten, teils wurde eine Mischung von Zymase und Coenzym erst 2 Stunden bei 25° hingestellt, bevor

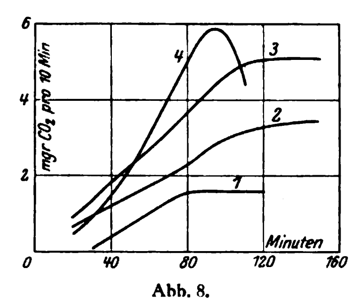


Abb. 8.

Gärgeschwindigkeit bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen, Versuch mit gefällter Zymase bei Zusatz von Hexosephosphat. Die Kurven stellen die CO_2-Ausscheidungen dar in einer Lösung von 0,25 g Zymase + 1,0 g Coenzym + 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat. Außerdem wurden zugefügt in Versuch 1: 0,7 ccm mol. H_3PO_4-Lösung + 0,7 mol. KH_2PO_4-Lösung, p_H der gesamten Mischung 5,3; in Versuch 2: 0,35 ccm mol. H_3PO_4-Lösung + 1,05 ccm mol. KH_2PO_4-Lösung, $p_H = 5,4$; in Versuch 3: 1,4 ccm mol. KH_2PO_4-Lösung, $p_H = 5,6$; in Versuch 4: 1,4 ccm mol. K_2HPO_4-Lösung, $p_H = 6,8$.

die übrigen Gärungskomponenten zugesetzt wurden. Die Aktivierungszeit war in beiden Fällen ungefähr dieselbe.

Eine beträchtliche Verkürzung der Aktivierungszeit bei Gegenwart von Hexosephosphat erreichte ich erst durch Benutzung einer „aktivierten" Coenzymlösung, die durch Kochen und Filtrierung von einer gärenden Zymaselösung hergestellt worden war; das Ergebnis eines solchen Versuchs ist in Abb. 9 wiedergegeben. Die Aktivierungszeit war bei Benutzung von gefällter Zymase und gewöhnlichem Coenzym

über 6 Stunden, bei Zusatz von Hexosephosphat wurde sie ungefähr um 3 Stunden vermindert, und bei Benutzung von „aktiviertem" Coenzym, das natürlich auch Hexosephosphat enthält, konnte sie bis 1½ Stunden heruntergebracht werden. Man wird aus diesem Versuch schließen können, daß die Aktivierung in diesem Falle (wenn also

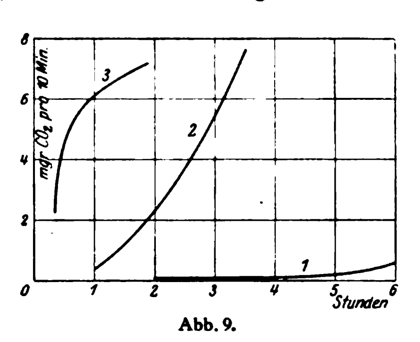


Abb. 9.

Schrittweise Verkürzung der Aktivierungszeit durch Hexosephosphat und „aktivierten" Kochsaft. Kurve 1 stellt die CO_2-Ausscheidung dar in einer Lösung von 0,25 g Zymase + 1 g Coenzym + 1,45 ccm mol. Phosphatlösung + 3 ccm 20proz. Dextroselösung + 5,55 ccm Wasser, also ohne Zusatz von Hexosephosphat. Kurve 2 die CO_2-Ausscheidung von 0,25 g Zymase + 1 g Coenzym + 5 ccm Hexosephosphat + 1,45 ccm mol. Phosphatlösung + 3 ccm 20proz. Dextrose + 0,55 ccm Wasser. Nachdem in einem entsprechenden Versuch alles freie Phosphat gebunden war, wurde das Ganze, um die Zymase zu zerstören, auf 70° erhitzt und filtriert. In 10 ccm des Filtrats („aktiviertes Coenzym" enthaltend) wurden 0,25 g Zymase + 0,5 g Dextrose + 1,5 ccm mol. Phosphatlösung gelöst; die CO_2-Ausscheidung in diesem Versuch ist in der Kurve 3 wiedergegeben.

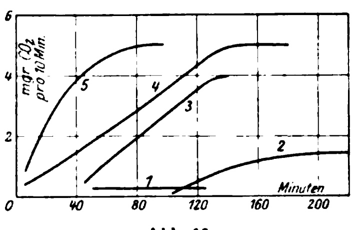


Abb. 10.

Verkürzung der Aktivierungszeit durch Coenzym, Hexosephosphat und Acetaldehyd. Kurve 1: CO_2-Ausscheidung in einer Lösung von 0,25 g Zymase + 0,5 g Dextrose + 1,4 ccm mol./3 sek. Phosphat + 5 ccm mol./5 Hexosephosphat + 3 ccm 1proz. Acetaldehyd + 0,6 ccm Wasser. $p_H = 5,9$. Kurve 2: 0,25 g Zymase + 1 g Coenzym + 0,5 g Dextrose + 1,4 ccm mol./3 sek. Phosphat + 8,6 ccm Wasser, $p_H = 5,7$. Kurve 3: 0,25 g Zymase + 1 g Coenzym + 0,5 g Dextrose + 1,4 ccm mol./3 sek. Phosphat + 3 ccm 1proz. Acetaldehyd + 5,6 ccm Wasser, $p_H = 5,5$. Kurve 4: 0,25 g Zymase + 1 g Coenzym + 0,5 g Dextrose + 1,4 ccm mol. Phosphat + 5 ccm mol./5 Hexosephosphat + 3,6 ccm Wasser, $p_H = 5,7$. Kurve 5: 0,25 g Zymase + 1 g Coenzym + 0,5 g Dextrose + 1,4 ccm mol. Phosphat + 5 ccm mol./5 Hexosephosphatlösung + 3 ccm 1proz. Acetaldehyd + 0,6 ccm Wasser, $p_H = 5,6$.

Hexosephosphat von vornherein in der gärenden Lösung vorhanden ist) nicht etwa von einer Umbildung der Zymase bedingt ist, sondern daß entweder eine Verbindung in dem Kochsaft in eine aktive Form übergeführt oder möglicherweise ein Stoff neu gebildet wird. Tatsächlich ist das letztere der Fall.

Von verschiedenen Seiten[1]) ist eine lange Reihe von Gärungsstimulatoren bekannt geworden[2]). Als solche Gärungsstimulatoren sind in erster Reihe Ketosäuren, Aldehyde, Ketone usw. zu nennen, d. h. Stoffe, die als Wasserstoffakzeptoren fungieren können und deren stimulierende Wirkung innig mit der Reduzierbarkeit zusammenhängt, was daraus bewiesen ist, daß sie verbraucht werden, indem sie stimulieren[3]).

In Verfolgung dieser Versuche zeigte es sich bald, daß man die Aktivierungszeit bei Gegenwart von Hexosephosphat durch Zusatz von Acetaldehyd bedeutend verkürzen kann. In Abb. 10 ist die schrittweise Verkürzung der Aktivierungszeit durch Zusatz von Coenzym, Hexosephosphat und Acetaldehyd wiedergegeben. Ohne Hexosephosphat und Acetaldehyd (Kurve 2) ist die Aktivierungszeit etwa 3 Stunden, und die maximale Gärgeschwindigkeit ist überhaupt sehr klein. Durch Zusatz von entweder Acetaldehyd (Kurve 3) oder Hexosephosphat (Kurve 4) kann man die Aktivierungszeit bis etwa 140 Minuten verkürzen und bei gleichzeitigem Züsatz der genannten Stoffe (Kurve 5) bis etwa 60 Minuten. Endlich stellt Kurve 1 die CO_2-Ausscheidung dar, wenn kein Coenzym in der Lösung vorhanden ist. Die Gärgeschwindigkeit ist in diesem Falle minimal. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit einem anderen Wasserstoffakzeptor, nämlich Methylenblau[4]), erhalten. Die Aktivierungszeit konnte in diesem Falle von 135 bis 45 Minuten hinabgedrückt werden. Doch war die erreichte maximale Gärgeschwindigkeit bei Zusatz von Methylenblau kleiner als ohne diesen Zusatz. Durch Zusatz von pulverisiertem Schwefel konnte die Aktivierungszeit nicht verkürzt werden.

Als Aktivatoren bei der Zymasegärung wirken also außer Phosphat und Coenzym Hexosephosphat und verschiedene Wasserstoffakzeptoren, z. B. Acetaldehyd. Es läßt sich nun zeigen, daß jedenfalls Hexosephosphat und die Wasserstoffakzeptoren zu zwei verschiedenen Gruppen von Aktivatoren gehören in dem Sinne, daß sie einander nicht ersetzen können. Das geht aus dem in Abb. 11 wiedergegebenen Versuch hervor. Der Versuch zeigt, daß man durch Zusatz von 3 ccm Hexosephosphat die Aktivierungszeit zu 190 Minuten verkürzen kann. Eine weitere

---

[1]) *M. Oppenheimer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **93**, 235, 1914/15; *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **71**, 75, 1915; 88, 145, 1918; *C. Neuberg* und *M. Ehrlich*, ebendaselbst **101**, 239, 1920; *A. Harden* und *F. R. Henley*, Biochem. Journ. **14**, 642, 1920; **15**, 175, 1921.

[2]) Vgl. z. B. die zusammenfassende Darstellung von *C. Neuberg* und *J. Hirsch* in Ergebn. d. Physiol. **21**, 400, 1923.

[3]) *C. Neuberg* und *M. Ehrlich*, diese Zeitschr. **101**, 276, 1920.

[4]) *C. Neuberg* und *M. Ehrlich* diese Zeitschr. **101**, 281, 1920; *A. Harden* und *F. R. Henley*, Biochem. Journ. **14**, 642, 1920.

Verkürzung läßt sich durch Steigerung der Menge des Hexosephosphats nicht erzwingen, dagegen sinkt die Aktivierungszeit, wenn außer 3 ccm Hexosephosphat auch 3 ccm Acetaldehyd zugefügt werden, zu 50 bis 60 Minuten. Umgekehrt läßt sich durch Acetaldehyd allein die Aktivierungszeit nicht so viel verkürzen als durch die vereinigte Wirkung von Hexosephosphat und Acetaldehyd.

Es fragt sich nun, welche Rolle Hexosephosphat und Acetaldehyd bei der Zymasegärung spielen. Während die Bedeutung des Hexosephosphats noch ganz dunkel ist, dürfte die Bedeutung des Acetaldehyds im Einklang mit dem von *Neuberg* aufgestellten Gärungsschema darin zu suchen sein, daß Wasserstoffakzeptoren bei der Oxydation von Methylglyoxal zu Brenztraubensäure mitwirken.

Bevor wir weiter gehen, möchte ich die Ergebnisse des zweiten Kapitels kurz zusammenfassen. Zur Darstellung von Mazerationssaft

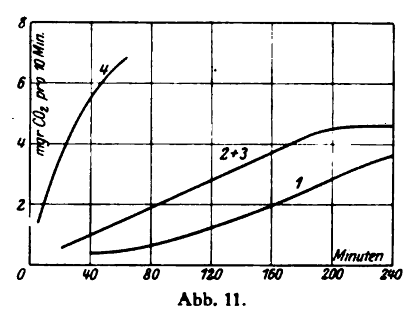


Abb. 11.

Hexosephosphat und Acetaldehyd gehören zu zwei verschiedenen Gruppen von Aktivatoren. Kurve 1: 0,25 g Zymase + 1 g Coenzym + 0,5 g Dextrose + 1,4 ccm mol./3 sek. Phosphat + 8,6 ccm Wasser. Kurve 2: 0,25 g Zymase + 1 g Coenzym + 0,5 g Dextrose + 1,4 ccm mol./3 sek. Phosphat + 3 ccm Hexosephosphat + 5,6 ccm Wasser. Kurve 3: 0,25 g Zymase + 1 g Coenzym + 0,5 g Dextrose + 1,4 ccm mol./3 sek. Phosphat + 5 ccm Hexosephosphat + 3,6 ccm Wasser. $p_H = 5,6$. Die Kurven 2 und 3 sind identisch. Kurve 4: 0,25 g Zymase + 1 g Coenzym + 0,5 g Dextrose + 1,4 ccm mol./3 sek. Phosphat + 3 ccm Hexosephosphat + 3 ccm Acetaldehyd + 2,6 ccm Wasser, $p_H = 5,3$.

wird die getrocknete Hefe mit Wasser bei 35 bis 40° mazeriert. Während der Mazeration findet oft eine ziemlich bedeutende Selbstgärung statt, und es wird dabei der in der getrockneten Hefe möglicherweise vorhandene Zucker und Hexosephosphat verbraucht. Der filtrierte Mazerationssaft zeigt bei Zusatz von Zucker eine oft ziemlich lange Aktivierungszeit, die hauptsächlich durch Mangel an Hexosephosphat verursacht wird und daher auch zum größten Teil durch Zusatz von Hexosephosphat aufgehoben werden kann. Wasserstoffakzeptoren sind dagegen in dem Mazerationssaft vorhanden. Die gefällte Zymase dagegen enthält nur Spuren von Wasserstoffakzeptoren und Hexosephosphat, und das gleiche gilt von dem eingedampften Kochsaft. Bei Mischung von gefällter Zymase, Coenzym, Zucker und Phosphat ist die Aktivierungszeit oft mehrere Stunden, ja bisweilen tritt überhaupt

keine Phosphatbindung ein. Um in diesem Falle die Aktivierungszeit beträchtlich zu verkürzen, müssen sowohl Wasserstoffakzeptoren, z. B. Acetaldehyd, und Hexosephosphat zugesetzt werden.

III. Die Kinetik der Zuckerzersetzung während der Phosphatveresterung.

Nach und nach haben wir eine ziemlich große Anzahl von Komponenten, die wahrscheinlich alle für das Zustandekommen einer Zymasegärung notwendig sind, kennen gelernt. Es sind dies 1. die eigentliche Zymase, 2. das Coenzym, 3. Zucker, 4. Phosphat, 5. Hexosephosphat, 6. Acetaldehyd. Man könnte nun fragen, ob die Zahl der notwendigen Gärungsfaktoren damit erschöpft ist. Diese Frage läßt sich nicht beantworten, doch ist so viel sicher, daß man durch Mischung der oben genannten Gärungskomponenten die Aktivierungszeit so stark verkürzen kann, daß sie für kinetische Studien keine Rolle spielt. Wenn man nun bei der Mannigfaltigkeit der bedingenden Faktoren eine Einsicht in das Zusammenspiel gewinnen will, läßt sich das wohl nur in der üblichen Weise erreichen, daß man die Konzentrationen der einzelnen Faktoren, einen nach dem anderen, variiert, indem man alle übrigen so konstant wie möglich hält. Als Maß der Reaktionsgeschwindigkeit wurde die pro 10 Minuten entwickelte maximale CO_2-Menge benutzt.

Die Darstellung der verschiedenen Gärungskomponenten ist oben (S. 236) beschrieben. Es wurde benutzt 1. gefällte, coenzymfreie Zymase (deren Phosphatgehalt vorher bestimmt war), 2. eingedampfter Kochsaft (gleichfalls mit einem vorher bestimmten Phosphatgehalt), 3. reine Dextrose, 4. eine molare Lösung von Kaliumphosphat, 5. eine $^1/_5$ mol. Lösung von Kaliumhexosephosphat und 6. eine 1 proz. Lösung von Acetaldehyd. Das Zusammenwirken dieser Faktoren muß bei konstanter Temperatur und konstanter Wasserstoffionenkonzentration untersucht werden. Wie die Temperatur konstant erhalten wird, ist oben beschrieben. Um die Wasserstoffionenkonzentration konstant zu halten, wurde erstens der eingedampfte Kochsaft auf einen bestimmten p_H-Wert eingestellt (eventuell durch Zusatz von $NaHCO_3$), alsdann wurde eine molare Phosphat- und eine $^1/_5$ mol. Hexosephosphatlösung von demselben p_H-Wert hergestellt. Die Wasserstoffionenkonzentration der übrigen Komponenten ist ohne Belang für die gesamte Wasserstoffionenkonzentration der Lösung.

Während die Konzentration der Zymase und des Coenzyms sich im Laufe des Versuchs ungefähr konstant hält, ändert sich dagegen die Konzentration des Zuckers, des Hexosephosphats und des Phosphats. Nun kann man die Konzentration der beiden ersten Stoffe, des Zuckers und des Hexosephosphats, so hoch nehmen, daß die durch die Gärung hervorgebrachte Änderung nicht in Betracht kommt. Dagegen läßt

sich die Konzentration der Phosphate über ein gewisses Maß hinaus nicht steigern, weil größere Phosphatmengen die Zymasewirkung stark hemmen. Um dennoch die Bestimmungen bei einigermaßen konstanter Phosphatkonzentration durchführen zu können, hat man erstens dafür zu sorgen, daß die Phosphatkonzentration beim Anfang der Versuche immer dieselbe ist. Das läßt sich leicht in der Weise erreichen, daß man den Phosphatgehalt der Zymase und des Coenzyms vorher bestimmt und dann berechnet, wieviel Phosphat man zufügen muß, um den Phosphatgehalt auf einen bestimmten Betrag zu bringen. Zweitens muß man dafür sorgen, daß die Aktivierungszeit möglichst kurz ist, was man durch Zusatz von Hexosephosphat und Acetaldehyd erreichen kann.

Ein Beispiel mag die Ausführung der Versuche illustrieren. Es soll die Geschwindigkeit der Zuckerzersetzung bei Anwendung von 0,5 g Zymase und 0,25 g Coenzym untersucht werden. Die Gesamtmenge der Flüssigkeit soll 10 ccm betragen, der PO_4-Gehalt soll 0,210 g sein. Zucker und Hexosephosphat sollen im Überschuß vorhanden sein. Man wägt dann 0,5 g Zymase + 2 g Sand + 0,6 g Dextrose, wonach das Ganze in einem kleinen Mörser zerrieben wird. Zu dieser Mischung gibt man 5 ccm $^1/_5$ mol. Kaliumhexosephosphatlösung und ferner (da 0,5 g Zymase und 0,25 g Coenzym zusammen 38 mg PO_4 enthalten) 1,80 ccm mol. Phosphatlösung + 3,2 ccm Wasser. Das Ganze wird in das Entwicklungsgefäß übergeführt und dieses mit Kohlensäure gefüllt. Die CO_2-Ausscheidung betrug in Perioden von 10 Minuten 0, 2,9, 4,0, 7,6, 11,2, 12,6, 12,2, 12,6. Als maximale Gärgeschwindigkeit wurden 12,5 mg CO_2 pro 10 Minuten genommen.

1. Die Geschwindigkeit der Zuckerzersetzung bei verschiedenen Zymase- und Coenzymkonzentrationen.

In den schon mehrmals erwähnten Untersuchungen von *Meyerhof*[1]) wurde auch der Einfluß der Coenzymkonzentration auf die Zymasegärung untersucht. *Meyerhof* fand, daß bei Benutzung von Mazerationssaft der „Gäranstieg“ (d. h. das Steigen der Gärgeschwindigkeit) bei zunehmendem Gehalt an Coenzym schneller verläuft. Später haben *Euler* und *Myrbäck*[2]) den Einfluß des Coenzyms auf die Gärgeschwindigkeit untersucht. Die genannten Forscher benutzten für ihre Versuche ausgewaschene Trockenhefe und fanden, daß beim Zusatz steigender Mengen Kochsaft die Gärgeschwindigkeit proportional mit der Cozymasemenge verläuft, um späterhin einem Maximum zuzustreben. Bei graphischer Darstellung erhält man Kurven, die mit den bei meinen Versuchen gefundenen ungefähr identisch sind.

[1]) *O. Meyerhof*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **102**, 185, 1918.
[2]) *H. Euler* und *K. Myrbäck*, ebendaselbst **131**, 179, 1923.

Ich gehe nun zu meinen eigenen Untersuchungen über und teile erst das Ergebnis einiger vorläufiger Versuche mit (Tabellen III und IV).

Tabelle III.

Zymase durch Fällung von dialysiertem Mazerationssaft dargestellt. 1 g Zymase enthielt 48 mg PO_4 und Spuren von Coenzym. Gesamtvolumen der gärenden Flüssigkeit 10 bis 11 ccm. Gesamtgehalt an Phosphat 96 mg PO_4. Die Zahlen mit fettem Druck sind die maximale abgegebene CO_2-Menge (Milligramm pro 10 Minuten). Temperatur 25°. Die Wasserstoffionenkonzentration wurde nicht bestimmt.

	0,5 g Coenzym	1 g Coenzym	2 g Coenzym
2 g Zymase	+ 0,25 ccm mol./7 sek. Phosphat + 1 g Dextrose + 10 ccm Wasser **8,4**	+ 0,25 ccm mol./7 sek. Phosphat + 1 g Dextrose + 10 ccm Wasser **15,2**	
1 g Zymase	+ 0.5 ccm mol./7 sek. Phosphat + 1 g Dextrose + 10 ccm Wasser **2,9**	+ 0,5 ccm mol./7 sek. Phosphat + 1 g Dextrose + 10 ccm Wasser **6,0**	+ 0,5 ccm mol./7 sek. Phosphat + 1 g Dextrose + 10 ccm Wasser **9,5**
0,5 g Zymase		+ 0,75 ccm mol./7 sek. Phosphat + 1 g Dextrose + 10 ccm Wasser **2,0**	+ 0,75 ccm mol./7 sek. Phosphat + 1 g Dextrose + 10 ccm Wasser **3,5**

Tabelle IV.

Zymase durch Fällung von dialysiertem Mazerationssaft dargestellt. 1 g Zymase enthielt 20,4 mg PO_4 und geringe Spuren von Coenzym. 1 g Coenzym enthielt 63,5 mg PO_4. Gesamtgehalt an PO_4 210 mg. Gesamtvolumen 10 ccm. Temperatur 25°.

	0,25 g Coenzym	0,5 g Coenzym
0,5 g Zymase	+ 5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphatlösung + 1,92 ccm mol. Phosphatlösung **10,0 mg CO_2**	+ 5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphatlösung + 1,75 ccm mol. Phosphatlösung + 3 ccm 20 proz. Dextroselösung + 0,25 ccm Wasser **15,2 mg CO_2**
0,25 g Zymase	+ 5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphatlösung + 1,97 ccm mol. Phosphatlösung + 3 ccm 20 proz. Dextrose **8,2 mg CO_2**	+ 5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphatlösung + 1,80 ccm mol. Phosphatlösung + 3 ccm 20 proz. Dextroselösung + 0,2 ccm Wasser **6,1 mg CO_2**

Aus den beiden angeführten Versuchen geht hervor, daß die Zuckerzersetzung sowohl von der Zymasekonzentration als von der Konzentration des im Kochsaft vorhandenen Coenzyms beeinflußt wird.

In den eigentlichen Versuchen wurde besonders Gewicht darauf gelegt, daß die verschiedenen, zusammengehörenden Versuche bei derselben Wasserstoffionenkonzentration durchgeführt wurden. Zwar ist das nicht ganz gelungen, doch dürften die Abweichungen, die hauptsächlich durch Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration während des Versuchs verursacht sind, für das Ergebnis der Versuche keine Rolle spielen. Im ganzen wurden drei Versuchsreihen durchgeführt.

In der ersten Versuchsreihe wurde die Aktivierungszeit nur durch Zusatz von Hexosephosphat vermindert. Die Zymase wurde durch Fällung von dialysiertem Mazerationssaft dargestellt. 1 g Zymase enthielt 42 mg PO_4, 1 g Coenzym 70 mg PO_4. Gesamtvolumen der gärenden Flüssigkeit 10 ccm. Gesamtgehalt an Phosphat 210 mg PO_4. Temperatur 25°. Das Ergebnis der Versuchsreihe ist in Tabelle V und Abb. 12 wiedergegeben, Kurve 1 stellt die maximale Kohlensäure-

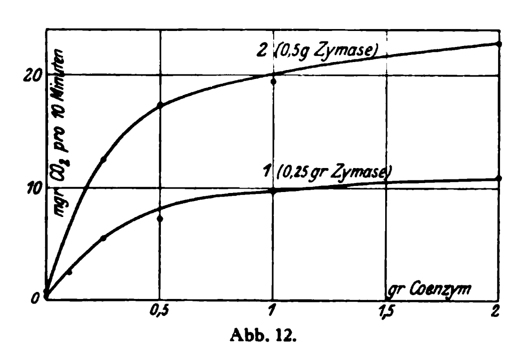


Abb. 12.

ausscheidung dar für 0,25 g Zymase und die auf der Abszissenachse angegebene Coenzymmenge; Kurve 2 gibt die entsprechenden Werte für 0,5 g Zymase.

In der zweiten Versuchsreihe wurde die Aktivierungszeit gleichfalls durch Zusatz von Hexosephosphat vermindert. Die Zymase war wie gewöhnlich durch Fällung von dialysiertem Mazerationssaft dargestellt und enthielt nur geringe Spuren von freiem Phosphat. Die Coenzymlösung wurde in folgender Weise dargestellt: 1,5 g Zymase + 12 g Coenzym + 1,5 g Dextrose wurden in 9 ccm Hexosephosphatlösung + 21 ccm Wasser gelöst. Nachdem alles freie Phosphat bei 25° verestert war, wurde das ganze auf 70 bis 80° erhitzt und filtriert. Das Filtrat, das Coenzym, etwas freie Dextrose und Hexosephosphat enthält, aber keine Zymase und nur Spuren von anorganischem Phosphat wurde direkt als Coenzymlösung benutzt, nachdem die Wasserstoffionenkonzentration durch Zusatz von $NaHCO_3$ auf etwa $p_H = 6{,}0$ gebracht worden war. Gesamtvolumen der gärenden Flüssigkeit wie gewöhnlich 10 ccm. Gesamtgehalt an Phosphat 192 mg PO_4. Tempe-

Tabelle V.

0,5 g Zymase	+ 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat + 2 ccm mol. Phosphatlösung + 3 ccm Wasser $p_H = 5{,}5$ **0,8 mg CO_2**		+ 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat + 1,8 ccm mol. Phosphatlösung + 3,2 ccm Wasser $p_H = 5{,}8$ **12,5 mg CO_2**	+ 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat + 1,6 ccm mol. Phosphatlösung + 3,4 ccm Wasser $p_H = 5{,}8$ **17,4 mg CO_2**	+ 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat + 1,25 ccm mol. Phosphatlösung + 3,75 ccm Wasser $p_H = 5{,}7$ **19,4 mg CO_2**	+ 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat + 0,5 ccm mol. Phosphatlösung + 4,5 ccm Wasser $p_H = 5{,}6$ **22,8 mg CO_2**
0,25 g Zymase	+ 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat + 2,1 ccm mol. Phosphatlösung + 2,9 ccm Wasser $p_H = 5{,}5$ **0,3 mg CO_2**	+ 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat + 2,01 ccm mol. Phosphatlösung + 3 ccm Wasser $p_H = 5{,}9$ **2,5 mg CO_2**	+ 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat + 1,91 ccm mol. Phosphatlösung + 3,1 ccm Wasser $p_H = 5{,}8$ **5,5 mg CO_2**	+ 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat. + 1,72 ccm mol. Phosphatlösung + 3,3 ccm Wasser $p_H = 5{,}8$ **7,3 mg CO_2**	+ 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat + 1,36 ccm mol. Phosphatlösung + 3,6 ccm Wasser $p_H = 5{,}8$ **9,7 mg CO_2**	+ 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat + 0,63 ccm mol. Phosphatlösung + 4,4 ccm Wasser $p_H = 5{,}8$ **10,9 mg CO_2**
	0 g Coenzym	0,1 g Coenzym	0,25 g Coenzym	0,5 g Coenzym	1 g Coenzym	2 g Coenzym

Tabelle VI.

0,5 g Zymase	+ 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat + 2 ccm mol. Phosphatlösung + 3 ccm Wasser $p_H = 5{,}5$ **0,8 mg CO_2**	+ 0,6 g Dextr. + 2,5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat + 2,0 ccm mol. Phosphatlösung + 4,3 ccm Wasser $p_H = 5{,}7$ **11,2 mg CO_2**	+ 0,6 g Dextr. + 2,5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat + 2,0 ccm mol. Phosphatlösung + 3,0 ccm Wasser $p_H = 5{,}8$ **17,4 mg CO_2**	+ 0,6 g Dextr. + 2,5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat + 2,0 ccm mol. Phosphatlösung + 0,5 ccm Wasser $p_H = 5{,}7$ **18,9 mg CO_2**
0,25 g Zymase	+ 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat + 2,1 ccm mol. Phosphatlösung + 2,9 ccm Wasser $p_H = 5{,}5$ **0,3 mg CO_2**	+ 0,6 g Dextr. + 2,5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat + 2,1 ccm mol. Phosphatlösung + 4,2 ccm Wasser $p_H = 5{,}8$ **5,6 mg CO_2**	+ 0,6 g Dextr. + 2,5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat + 2,1 ccm mol. Phosphatlösung + 2,9 ccm Wasser **8,2 mg CO_2**	+ 0,6 g Dextr. + 2,5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphat + 2,1 ccm mol. Phosphatlösung + 0,4 ccm Wasser $p_H = 5{,}8$ **8,4 mg CO_2**
	0 g Coenzym	1,2 ccm Coenzymlösung = 0,5 g Coenzym	2,5 ccm Coenzymlösung = 1 g Coenzym	5 ccm Coenzymlösung = 2 g Coenzym

ratur 25°. Das Ergebnis der Versuchsreihe ist in Tabelle VI wiedergegeben.

In der dritten Versuchsreihe endlich, die mit besonderer Sorgfalt durchgeführt wurde, wurde die Aktivierungszeit sowohl durch Hexosephosphat als durch Acetaldehyd verkürzt. Die Zymase wurde wie gewöhnlich durch Fällung von dialysiertem Mazerationssaft dargestellt; 1 g Zymase enthielt 34 mg PO_4; 1 g Coenzym 75 mg PO_4. Gesamtvolumen der gärenden Flüssigkeit 10 ccm. Gesamtgehalt an Phosphat 210 mg PO_4. Das Ergebnis der Versuchsreihe ist in Tabelle VII und Abb. 13 wiedergegeben. In Tabelle VII findet man den Verlauf der Kohlensäureentwicklung in den einzelnen Versuchen in Milligrammen CO_2 pro 10 Minuten, unten ist mit fettem Druck die maximale CO_2-Entwicklung (d. h. die während der konstanten Periode der CO_2-Abscheidung durchschnittlich abgegebene CO_2-Menge). Diese letzten Zahlen sind in Abb. 13 in Kurvenform dargestellt, Kurve 1 für 0,25 g Zymase und Kurve 2 für 0,5 g Zymase.

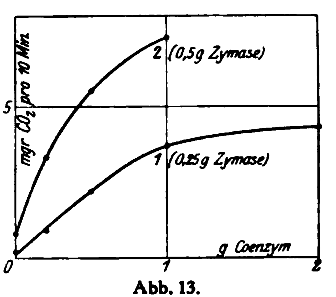


Abb. 13.

Aus allen drei Versuchen geht übereinstimmend hervor, daß bei Überschuß von Dextrose, Hexosephosphat, Phosphat (und eventuell Acetaldehyd) die maximale CO_2-Ausscheidung sowohl von der Konzentration der Zymase als auch des Coenzyms bedingt ist. Bei konstanter Zymasekonzentration steigt die Gärungsgeschwindigkeit anfänglich ungefähr proportional der Coenzymkonzentration; nach und nach wird die Steigerung langsamer, und wenn die Coenzymkonzentration etwa 0,5 bis 1,0 g pro 10 ccm beträgt, erreicht die Gärgeschwindigkeit einen konstanten Wert, der durch Vermehrung der Coenzymkonzentration nicht (oder jedenfalls nur unbedeutend) vergrößert wird. Innerhalb der untersuchten Grenzen ist die Geschwindigkeit der CO_2-Ausscheidung der Zymasekonzentration proportional.

2. Die Geschwindigkeit der Zuckerzersetzung bei verschiedenen Hexose- und Phosphatkonzentrationen.

Der Einfluß der Zuckerkonzentration auf die Gärungsgeschwindigkeit ist sehr schwierig zu untersuchen, weil jene sich bei niedrigen Konzentrationen — und eben diese sind von besonderem Interesse — fortwährend und stark ändert. Mit Sicherheit läßt sich feststellen, daß die Gärungsgeschwindigkeit innerhalb recht weiter Grenzen von der Zuckerkonzentration unabhängig ist. Dies geht z. B. aus Tabelle VIII hervor. Die Zahlen bedeuten die Gärungsgeschwindigkeit bei verschiedenen Zymase- und Dextrosekonzentrationen. Ohne Zucker-

Tabelle VII.

Minuten	0,25 g Zymase					0,5 g Zymase			
	+ 0 g Coenzym + 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^{1}/_{5}$ mol. Hexosephosphat + 3 ccm 1 proz. Acetaldehyd + 2 ccm mol. Phosphatlösung $p_H = 6,1$	+ 0,1 g Coenzym + 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^{1}/_{5}$ mol. Hexosephosphat + 3 ccm 1 proz. Acetaldehyd + 2 ccm mol. Phosphatlösung $p_H = 6,0$	+ 0,25 g Coenzym + 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^{1}/_{5}$ mol. Hexosephosphat + 3 ccm 1 proz. Acetaldehyd + 1,9 ccm mol. Phosphatlösung + 0,1 ccm Wasser $p_H = 5,9$	+ 0,5 g Coenzym + 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^{1}/_{5}$ mol. Hexosephosphat + 3 ccm 1 proz. Acetaldehyd + 1,7 ccm mol. Phosphatlösung + 0,3 ccm Wasser $p_H = 5,8$	+ 1 g Coenzym + 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^{1}/_{5}$ mol. Hexosephosphat + 3 ccm 1 proz. Acetaldehyd + 1,3 ccm mol. Phosphatlösung + 0,7 ccm Wasser $p_H = 5,8$	+ 0 g Coenzym + 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^{1}/_{5}$ mol. Hexosephosphat + 3 ccm 1 proz. Acetaldehyd + 1,8 ccm mol. Phosphatlösung + 0,2 ccm Wasser $p_H = 6,1$	+ 0,1 g Coenzym + 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^{1}/_{5}$ mol. Hexosephosphat + 3 ccm 1 proz. Acetaldehyd + 1,9 ccm mol. Phosphatlösung + 0,1 ccm Wasser $p_H = 5,9$	+ 0,25 g Coenzym + 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^{1}/_{5}$ mol. Hexosephosphat + 3 ccm 1 proz. Acetaldehyd + 1,8 ccm mol. Phosphatlösung + 0,2 ccm Wasser $p_H = 5,9$	+ 0,5 g Coenzym + 0,6 g Dextrose + 5 ccm $^{1}/_{5}$ mol. Hexosephosphat + 3 ccm 1 proz. Acetaldehyd + 1,6 ccm mol. Phosphatlösung + 0,4 ccm Wasser $p_H = 5,9$
10			0,7	1,4	0,9		2,0	2,3	4,7
20	0,2	0,9	1,4	1,6	1,4		2,3	2,3	8,5
30	0,2	1,1	1,4	2,0	2,0	0,5	3,2	6,3	7,0
40	0,2	0,9	1,8	2,5	3,6	0,7	3,2	5,6	7,2
50	0,2	0,9	2,2	2,7	3,6	1,1	3,6	5,0	6,3
60	0,2	0,7	2,5	2,7	3,6	0,7	3,2	5,0	
70			2,0	3,1	4,7				
80			2,2	3,6	4,3				
90			2,2	4,0	4,2				
100			2,3	3,4	4,2				
110			2,2	3,8	4,3				
120			2,0	3,3					
Maximale CO_2-Ausscheidung pro 10 Minuten.									
	0,2	**0,9**	**2,2**	**3,7**	**4,3**	**0,8**	**3,3**	**5,5**	**7,3**

zusatz ist die CO_2-Ausscheidung nur gering, von der Vergärung des zugesetzten Hexosephosphats herrührend. Von 0,6 bis 3 Proz. Zucker ist die Gärungsgeschwindigkeit ungefähr dieselbe. Wie sie sich bei kleinen Zuckerkonzentrationen verhält, ist nicht möglich, direkt zu untersuchen. Doch darf man wohl mit einiger Wahrscheinlichkeit annehmen, daß hier eine Proportionalität zwischen der Gärgeschwindigkeit und der Zuckerkonzentration vorhanden ist.

Tabelle VIII.

	p_H	Dextrosekonzentration				
		0	0,6 proz.	1 proz.	2 proz.	3 proz.
0,25 g Zymase + 0,5 g Coenzym + 5 ccm Hexosephosphat + 3 ccm 1 proz. Acetaldehyd + 1,72 ccm mol. Phosphat + 0,3 ccm Wasser	5,81	0,2	4,0	3,8	4,1	4,2
0,5 g Zymase + 0,5 g Coenzym + 5 ccm Hexosephosphat + 3 ccm 1 proz. Acetaldehyd + 1,62 ccm mol. Phosphat + 0,4 ccm Wasser	5,86	1,1	8,6	7,5	7,4	

Bei Untersuchungen über den Einfluß der Phosphatkonzentration auf die Gärgeschwindigkeit stößt man wieder auf dieselbe Schwierigkeit, daß die Phosphatkonzentration sich während des Versuchs sehr schnell ändert. Eingehend ist diese Frage von *Harden* und *Young*[1]) untersucht worden. Es geht aus diesen Untersuchungen hervor, daß Zusatz von kleinen Phosphatmengen die Gärgeschwindigkeit sehr stark beschleunigt (wie es auch oben besprochen ist), andererseits üben auch Phosphate in höheren Konzentrationen eine hemmende Wirkung auf die Gärgeschwindigkeit aus.

Zusammenfassend können wir also die Wirkung des Zuckers und der Phosphate auf die Gärgeschwindigkeit betreffend sagen, daß diese wahrscheinlich bei kleineren Konzentrationen ungefähr proportional der Zucker- oder Phosphatmenge ist. Bei höheren Konzentrationen ist entweder die Gärgeschwindigkeit konstant, wie beim Zucker, oder abnehmend, wie beim Phosphat.

Dieser Schluß wird auch durch eine nähere Untersuchung der Phosphatkurven bestätigt. Gibt man zu einem gärfähigen Mazerationssaft, der Zucker in Überschuß enthält, eine kleine Phosphatmenge, so stellt sich, wie schon oben beschrieben, eine starke Beschleunigung der

[1]) *A. Harden* und *W. J. Young*, Proc. Roy. Soc. **80**, 299, 1908.

CO_2-Abgabe ein. Nachdem die CO_2-Ausscheidung ein Maximum erreicht hat, sinkt sie wieder ab bis zu dem ursprünglichen Wert (vgl. Abb. 14, Kurve 1). Diese Verminderung der CO_2-Ausscheidung tritt erst ein, wenn ungefähr alles freie Phosphat verbraucht ist, und wird bekanntlich durch die Verminderung der freien Phosphatmenge verursacht. Weil nun dieser fallende Teil der Phosphatkurve ungefähr dasselbe Aussehen hat wie die Kurve der Reaktionsgeschwindigkeit bei einer monomolekularen Reaktion, darf man wohl schließen, daß bei kleinen Phosphatkonzentrationen die Gärgeschwindigkeit ungefähr der Phosphatkonzentration proportional ist.

Gibt man nun zu einem gärfähigen Mazerationssaft dieselbe Phosphatmenge wie oben. aber statt Zucker in Überschuß nur eine kleine Zuckermenge, so erhält man eine Kurve, wie sie in Abb. 14, Kurve 2 dargestellt ist. Das Aussehen der Kurve 2 ist ungefähr dasselbe wie das der Kurve 1. Die CO_2-Ausscheidung steigt, erreicht ein Maximum

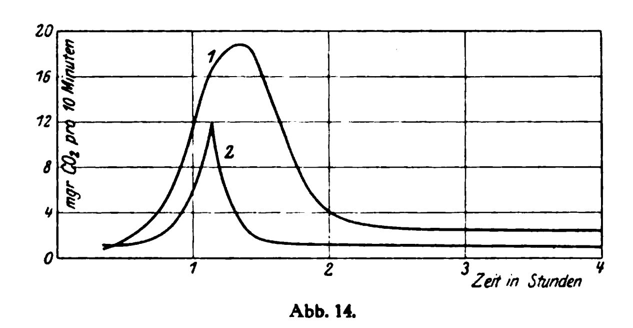


Abb. 14.

und fällt wieder ab. Der Abfall wird hier durch Mangel an Zucker verursacht, und man darf wohl aus der Form der Kurve schließen, daß hier bei ganz niedrigen Zuckerkonzentrationen eine gewisse Proportionalität zwischen Zuckerzersetzung und Zuckerkonzentration besteht.

3. Einfluß der Konzentration des Hexosephosphats und des Acetaldehyds auf die Gärungsgeschwindigkeit.

Die Bedeutung des Hexosephosphats für die Zymasegärung ist oben ausführlich besprochen worden. Die Aktivierungszeit, die in einer Mischung von Zymase, Coenzym, Zucker, Phosphat und Acetaldehyd besteht, ist, wie oben gesagt, in erster Reihe von dem Fehlen an Hexosephosphat bedingt. Die autokatalytische Form, die die Phosphatkurve in diesem Falle hat, ist ein Beweis dafür, daß die Gärgeschwindigkeit innerhalb gewisser Grenzen mit der Konzentration des Hexosephosphats ungefähr proportional ist. Daß diese Propor-

tionalität nicht unbeschränkt besteht, geht aus Abb. 11, Kurven 2 und 3 hervor. Es wurde dort gezeigt, daß die Phosphatkurven, die man durch Zusatz von 3 und 5 ccm $^1/_5$ mol. Hexosephosphatlösung in 10 ccm erhält, durchaus identisch sind.

Somit kommt man zu dem Ergebnis, daß die Gärgeschwindigkeit bei niedriger Hexosephosphatkonzentration dieser ungefähr proportional ist, bei höheren Konzentrationen dagegen unabhängig von der Hexosephosphatkonzentration[1]), also wieder dasselbe Ergebnis, das wir betreffend den Einfluß des Coenzyms auf die Gärgeschwindigkeit erhielten.

Ganz dasselbe, was über die Wirkung des Hexosephosphats auf die Gärgeschwindigkeit gesagt wurde, gilt auch für die Wirkung des Acetaldehyds. Als Belege hierfür sei auf Abb. 10, Kurven 4 und 5 hingewiesen. Die Aktivierungszeit bei dem in Kurve 4 dargestellten Versuch ist durch Fehlen eines Wasserstoffakzeptors verursacht, und man wird aus diesem Versuch schließen können, daß bei kleinen Konzentrationen von Wasserstoffakzeptoren die Gärgeschwindigkeit mit der Menge von diesen ungefähr proportional ist. Aber ebensowenig wie man durch Zusatz von Hexosephosphat die Gärgeschwindigkeit unbegrenzt steigern kann, läßt sich dies bei Zusatz von Acetaldehyd erreichen. Im Gegenteil nimmt dann die Gärgeschwindigkeit wieder ab, was z. B. aus einigen Untersuchungen von *Harden* und *Henley*[2]) hervorgeht. Ganz entsprechendes habe ich auch bei eigenen Untersuchungen gefunden.

IV. Allgemeine Ergebnisse.

Aus den zahlreichen Untersuchungen, die im Laufe der letzten 20 Jahre über die Zymasegärung angestellt sind, geht zweifellos hervor, daß dieser Vorgang sehr kompliziert ist. Durch Untersuchungen von *Harden* und *Young* wurde gezeigt, daß, um eine Zymasegärung hervorzurufen, nicht nur die eigentliche Zymase nötig ist, sondern auch Coenzym und anorganisches Phosphat, das während der Gärung in Hexosephosphat übergeführt wird. Bei Mischung dieser verschiedenen Komponenten tritt jedoch die von der Zuckerzersetzung bedingte CO_2-Entwicklung nicht sofort ein, sondern erst nach einer kürzeren oder längeren Zeit. Nachdem die CO_2-Entwicklung begonnen hat, steigt sie mit allmählich wachsender Geschwindigkeit bis zum Er-

---

[1]) *H. Euler* und *K. Myrbäck* (Zeitschr. f. physiol. Chem. **138**, 266, 1924) finden eine Abnahme der Gärgeschwindigkeit bei höheren Hexosephosphatkonzentrationen.

[2]) *A. Harden* und *F. R. Henley*, Biochem. Journ. **14**, 648, 1920.

reichen eines Maximalwertes; nachher, wenn alles freie Phosphat verbraucht ist, sinkt die CO_2-Entwicklung wieder zu einem konstanten Wert. Die Zeit, die von Beginn des Versuchs bis zum Erreichen des Maximalwertes verstreicht, nenne ich die Aktivierungszeit, und es entsteht dann die Frage: Wodurch ist diese Aktivierungszeit bedingt? Wie *Meyerhof* zeigen konnte, tritt bei Zusatz von Hexosephosphat zu einem Mazerationssaft, der Zymase, Coenzym, Zucker und Phosphat enthält, die CO_2-Ausscheidung sofort ein, und die autokatalytische Form der Phosphatkurve ist seiner Auffassung nach eben durch Mangel an Hexosephosphat beim Anfang der Gärung bedingt. Diese Auffassung kann ich bestätigen. Es läßt sich zeigen, daß Hexosephosphat für die Zymasegärung ebenso notwendig ist wie die oben genannten Stoffe. Ferner sind Wasserstoffakzeptoren, z. B. Acetaldehyd, deren stimulierende Wirkung auf die Zymasegärung von *Neuberg*, *Harden* und *Henley* und mehreren anderen Forschern untersucht ist, notwendige Bedingungen für die Zymasegärung. Durch gleichzeitigen Zusatz von Hexosephosphat und Acetaldehyd läßt sich die Aktivierungszeit zwar nicht ganz aufheben, aber doch stark verkürzen.

Um nun den Einfluß der Konzentration der oben genannten sieben verschiedenen Gärungskomponenten auf die Geschwindigkeit der Zuckerzersetzung zu untersuchen, ging ich in der Weise vor, daß ich die Konzentration der einzelnen Komponenten einer nach dem anderen variierte, indem gleichzeitig die Konzentration der übrigen Komponenten, die in Überschuß zugefügt wurden, so konstant wie möglich gehalten wurde. Auch die Temperatur und die Wasserstoffionenkonzentration wurden konstant gehalten. Das Ergebnis dieser Versuche war, daß die Gärgeschwindigkeit wahrscheinlich immer ungefähr proportional der Zymasekonzentration ist. Für alle übrigen Gärungskomponenten gilt wahrscheinlich folgendes Gesetz: Bei kleinen Konzentrationen steigt die Gärgeschwindigkeit ungefähr proportional der Konzentration; bei höheren Konzentrationen des betreffenden Gärungskomponenten ist dagegen die Gärgeschwindigkeit unabhängig von der Konzentration. Bei graphischer Darstellung (Konzentration als Abszisse und Gärgeschwindigkeit als Ordinate) erhält man eine Kurve, die am Anfang ungefähr gerade ist, nach und nach biegt die Kurve um und verläuft dann ungefähr parallel der Abszissenachse (oder kann sogar wieder fallen). Wir können auch das Verhältnis in folgender Weise formulieren: Die Gärgeschwindigkeit ist sowohl durch die Zymasekonzentration bestimmt, als auch durch die Konzentration einer der übrigen Gärungskomponenten, und zwar durch diejenige, die in der relativ kleinsten Menge vorhanden ist [der begrenzende (limiting) Faktor]. Doch scheint es, daß in gewissen Fällen nicht nur ein, sondern auch zwei oder mehrere der Gärungskomponenten gleich-

zeitig als begrenzende Faktoren wirken können. So kann man (wie aus Abb. 10 hervorgeht), wenn geringe Mengen von Acetaldehyd oder Hexosephosphat in der gärenden Lösung vorhanden sind, die Gärgeschwindigkeit durch Zugabe entweder von Hexosephosphat oder von Acetaldehyd steigern. Es stimmt dieses Ergebnis ungefähr mit den Anschauungen, die man betreffend der Wirkung der äußeren Faktoren (Licht, Kohlensäure und Temperatur) auf die Geschwindigkeit der CO_2-Assimilation oder über den Einfluß der Wachstumsfaktoren auf die Stoffproduktion bei Pflanzen gewonnen hat.

Über den Blutchemismus während der Tätigkeit der Verdauungsdrüsen.

Von

Kantaro Onohara (Osaka).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 21. November 1924.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Über den Blutchemismus während der Tätigkeit der Verdauungsdrüsen ist noch wenig bekannt. Es ist auch kaum möglich, diesen Chemismus während der Arbeit einer Drüse allein zu untersuchen, da bei der Verdauung, auch wenn man nur die erste oder die ersten beiden Stunden nach einer Nahrungsingestion berücksichtigt, neben den Magendrüsen auch bereits das Pankreas, die Duodenal- und oberen Jejunaldrüsen und auch die Leber Säfte sezernieren. Man hat bei einer so angeordneten Untersuchung es gewiß mit einer vornehmlichen, aber nicht ausschließlichen Wirkung der Magendrüsenarbeit auf den Blutchemismus zu tun. Man kann also nur untersuchen, wie sich dieser Chemismus in der ersten oder mittleren oder in den späteren Phasen einer Verdauungsperiode verhält. Meine Arbeit befaßt sich mit dem Blutchemismus in den ersten 3 Stunden nach einer Nahrungsingestion.

Ich habe diese Nahrungsingestion nun unter verschiedenen Bedingungen sich vollziehen lassen: Erstens so, daß der Hund die betreffende Nahrung in üblicher, normaler Weise verzehrte; zweitens derart, daß ich dem Tiere die betreffende Nahrung durch eine vorher angelegte permanente Magenfistel einführte; drittens in der Weise, daß ich das Tier, das dann zu diesem Zwecke ösophagotomiert wurde, mit der betreffenden Nahrung scheinfütterte.

Im ersten Falle (Normalfütterung) blieb der zur Abscheidung gelangende Magensaft genau wie alle anderen Säfte im Körperinnern, und die ganze Drüsenarbeit vollzog sich unter dem Einfluß der Gesamtheit der physiologischen Erregung. Im zweiten Falle (Stopffütterung)

war lediglich die cephalogene Drüsenerregung ausgeschaltet, aber die abgesonderten Saftmengen blieben genau wie im ersten Falle im Körper. Im dritten Falle (Scheinfütterung) wurde nur die cephalogene Erregung der Drüsen in Anspruch genommen und der produzierte Magensaft floß in großen Mengen ab. Es war von Interesse, einmal den Blutchemismus auch unter diesen verschiedenen Bedingungen zu untersuchen und ihre Wirkung auf ihn zu vergleichen.

Ich untersuchte die Trockensubstanz des Blutes, den Chlorgehalt und Zuckergehalt desselben nach der *Bang*schen Methode, und zwar machte ich alle diese Bestimmungen unmittelbar vor der Fütterung, die stets bei nüchternem Tiere (15 Stunden nach der letzten Nahrungs- und Wasseringestion) vorgenommen wurde, darauf ½, 1, 1½, 2, 2½ und 3 Stunden nach Beginn der Fütterung. Bei manchen Versuchen wurden die Trockensubstanzbestimmungen auch nach der Makromethode gemacht. Alle Versuche wurden an Hunden vorgenommen. Als Nahrung zur Fütterung diente bei diesen Versuchen ein Pfund frisches, gehacktes Pferdefleisch oder 100 g Margarine oder ein Brei aus Kohlehydraten.

Außerdem habe ich unter Anwendung der Stopffütterung Versuche mit einem Pfund Fleisch oder 100 g Margarine oder einem gekochten Brei aus 20 g Zucker, 20 g Maizena und 200 g Wasser gemacht, um den Einfluß verschiedener Nahrungsingestionen (Fleisch, Fett und Kohlehydrate) bei im übrigen denselben Versuchsbedingungen an einem und demselben Versuchstiere vergleichen zu können.

Die Grundlage für die Bearbeitung meiner Versuchsergebnisse aber muß die Beobachtung des nüchternen Tieres sein.

I. Beobachtungen am nüchternen Tiere.

Wenn man bei einem Hunde, der 15 Stunden völlig nüchtern gehalten wurde, nunmehr während 3 Stunden in halbstündigen Intervallen die Bluttrockensubstanz und den Chlornatriumgehalt des Blutes untersucht, erhält man durchgängig immer fast genau dieselben Werte. Bei der Einzeichnung der Analysenresultate in ein Kurvenblatt bekommt man also zwei fast gerade, unter sich annähernd parallel verlaufende Linien (siehe Abb. 1, Kurve I).

II. Beobachtungen bei Normalfütterung.

Wenn man einen Hund in gewöhnlicher Weise mit einem Pfund *Pferdefleisch* füttert, so zeigt die Trockensubstanz des Blutes im allgemeinen die Tendenz zu stärkerer *Abnahme*. Öfters kommt es im Verlauf der ersten Stunde nach der Fütterung auch zu einer leichten, vorübergehenden Steigerung, und eine Steigerung findet sich gelegentlich auch am Ende der dritten Stunde; es können auch zu anderen Zeiten vorübergehende Steigerungen erscheinen. Das alles aber ändert

nichts an der Tatsache, daß, wenn auch mit Unterbrechungen oder gar mit Remissionen die Trockensubstanz des Blutes in den ersten 3 Stunden nach einer Normalfütterung mit Fleisch abnimmt, also *das Blut wasserreicher* wird (siehe Abb. 1, Kurve II).

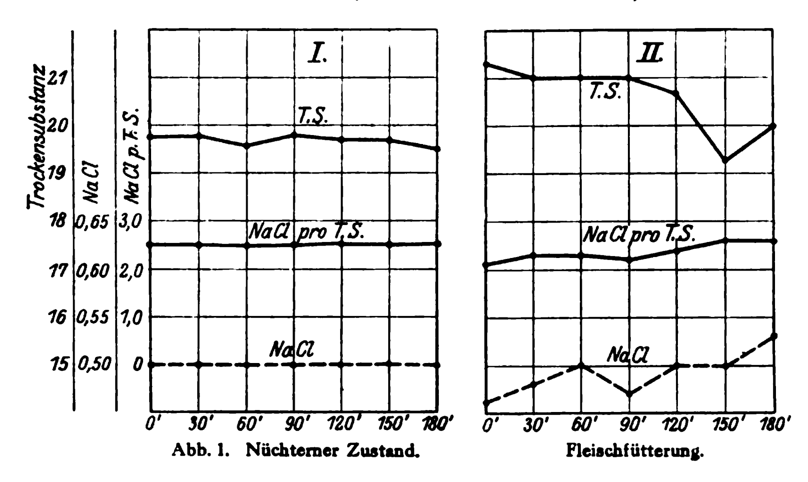


Abb. 1. Nüchterner Zustand. Fleischfütterung.

Bei einer Normalfütterung mit dem *Kohlehydratbrei* zeigt der Verlauf der Trockensubstanzkurve des Blutes denselben Charakter, wie bei der Fleischfütterung (siehe Abb. 2, Kurve III).

Bei einer Normalfütterung mit *Fett* (Margarine) aber nimmt der Trockensubstanzgehalt des Blutes im allgemeinen zu oder bleibt unverändert. *Fettfütterung bewirkt also* im Gegensatz zur Fleisch- und Kohlehydratfütterung, *daß das Blut wasserärmer wird oder* bei gewissen Schwankungen *ungefähr seinen ursprünglichen Wassergehalt behauptet* (siehe Abb. 2, Kurve IV).

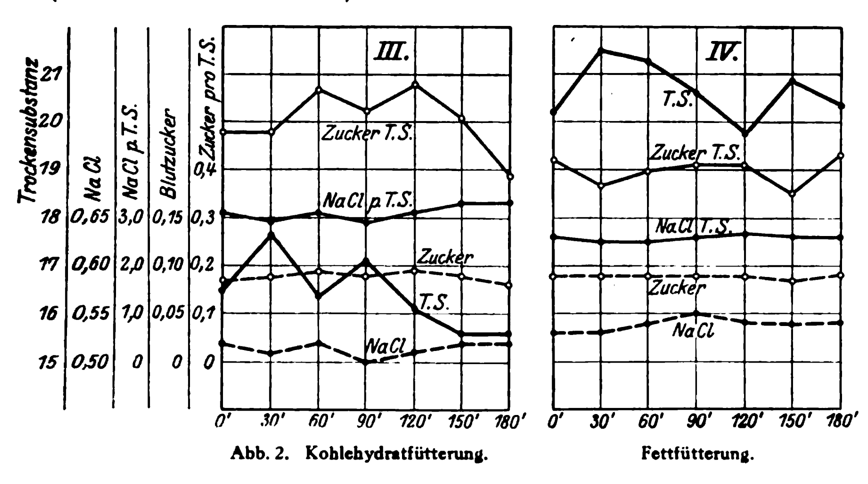


Abb. 2. Kohlehydratfütterung. Fettfütterung.

Da Fleisch und Kohlehydrat eine starke, Fett aber eine sehr schwache Magen- und Pankreassekretion macht, ja eine vorhandene stärkere Sekretion sogar hemmen kann, und da Fett nur die Gallensekretion stärker anregt, so wird es verständlich, daß Fleisch und Kohlehydrat dem Blute sehr viel mehr Wasser entziehen und folglich auch in sehr viel intensiverer Weise indirekt (Reflexwirkungen ?) auf den Ersatz des verlorenen Blutwassers durch Gewebswasser einwirken müssen, als es das Fett vermag. *Es tritt demnach*, wie das aus den Trockensubstanzkurven unmittelbar hervorgeht, *ein überkompensatorischer Gewebswassererguß in das Blut gewöhnlich bei Fleisch- und Kohlehydratfütterung, nicht aber bei Fettfütterung auf.* Hier kann sogar der kompensatorische Gewebswassererguß ausbleiben und die Trockensubstanz öfters zunehmen.

Ferner aber ergibt sich aus diesen Beobachtungen, daß in erster Linie durch die Magen- und Pankreassaftsekretion und nicht so sehr durch die Gallensekretion der kompensatorische bzw. überkompensatorische Gewebswassererguß in das Blut hervorgerufen wird.

Das Ergebnis dieser Beobachtungen über das Verhalten der Bluttrockensubstanz bei verschiedener Normalfütterung ist folgendes:

1. Bei starker Magen- und Pankreassekretion setzt ein starker Wasserstrom vom Gewebe ins Blut ein.

2. Der Trockensubstanzgehalt des Blutes hängt ab von dem Verhältnis der antagonistischen Faktoren: Blutwasserverlust durch die Drüsensekretion und Gewebswasserzustrom zum Blut, als einem kompensatorischen oder überkompensatorischen Phänomen, abgesehen von den anderen Wegen, auf denen der Körper Wasser verliert.

Nächst dem Wassergehalt des Blutes interessiert im Hinblick auf die Salzsäurebildung im Magen und den Kochsalzgehalt der Verdauungssekrete vor allem der *Kochsalzgehalt des Blutes.*

Bei der Normalfütterung mit *Fleisch* geht der Kochsalzgehalt des Blutes in den ersten 3 Stunden nach der Fütterung entweder etwas in die Höhe oder bleibt unverändert oder sinkt ausnahmsweise ein wenig. Alles vollzieht sich unter gewissen Schwankungen. Bei der Berechnung auf die Trockensubstanz geht der Kochsalzgehalt des Blutes aber gewöhnlich leicht in die Höhe oder bleibt unverändert. Geringe Senkungen sind die Ausnahme. Aus alledem ergibt sich, daß das während dieser ersten dreistündigen Verdauungsphase wasserreicher werdende Blut den prozentigen Kochsalzgehalt seines Serums nur wenig verändert, aber doch eine gewisse Neigung zeigt, ihn zu erhöhen. Daraus folgt, daß das in das Blut einströmende Gewebswasser im wesentlichen die Kochsalzkonzentration des Blutserums haben muß; die Steigerung des Kochsalzgehaltes im frischen Blute während der Verdauung muß aber, da sie häufig progressiv verläuft

und mit sich verstärkender Sekretion gesteigert wird, also mit erhöhter Chlorabgabe durch die Drüsen zunimmt, wahrscheinlich mit der Annahme erklärt werden, daß auch *in den Geweben verankertes Kochsalz* überkompensatorisch in größeren Mengen in Lösung gebracht und ins Blut abgeführt wird (s. Kurve II).

Bei der Normalfütterung mit *Kohlehydrat* zeigt der Kochsalzgehalt des Blutes nur geringe Schwankungen. Sowohl bei der Berechnung auf das frische Blut, wie auf die Trockensubstanz bleibt er meist unter Schwankungen unverändert oder steigt ausnahmsweise auch minimal an (s. Kurve III).

Bei der Normalfütterung mit *Fett* bleibt der Kochsalzgehalt des Blutes bei entsprechender Berechnung unverändert oder sinkt etwas (s. Kurve IV).

Das Ergebnis dieser Versuche ist folgendes:

1. Je stärker die Drüsensekretion ist, um so mehr wird Kochsalz mit dem Gewebswasser und auch durch Vermittlung dieses aus den Geweben selbst ins Blut gezogen.

2. Der Kochsalzgehalt des Blutes hängt ab von dem Verhältnis der antagonistischen Faktoren des Kochsalzverlustes bei der Sekretion und dem Kochsalzersatz aus der Gewebsflüssigkeit und aus den Geweben, abgesehen vom Kochsalzverlust durch den Harn.

Nächst der Trockensubstanz und dem Chlor hat das Verhalten des *Blutzuckers* bei der Verdauung insofern ein gewisses Interesse, als die Drüsentätigkeit und alle damit verknüpften Vorgänge ja möglicherweise auch einen erhöhten Zuckerverbrauch bedingen, und daß dadurch Einwirkungen auf den Blutzucker zustande kommen können.

Bei der Normalfütterung mit Fleisch (Kurve II), Kohlehydrat (Kurve III) oder Fett (Kurve IV) ändert sich der Blutzuckergehalt bei der Berechnung auf das frische Blut entweder nicht oder zeigt in den ersten 3 Stunden der Verdauung eine vorübergehende, geringfügige, allmählich an- und abschwellende Erhebung. Bei der Berechnung auf die Trockensubstanz nimmt der Blutzucker bei Fleisch- und Kohlehydratfütterung im allgemeinen vorübergehend zu, bei der Fettfütterung aber nimmt er ab.

Als Ergebnis dieser Beobachtungen können wir feststellen, daß der Blutzuckergehalt des Serums sich während der Verdauung wenig ändert oder vorübergehend ansteigt. Der Anstieg fällt ebensowohl mit der Erhöhung der Sekretion, wie auch mit der Ernährung durch zuckergebende Substanzen (Fleisch und Kohlehydrat) zusammen. Es kann daher durch meine Versuche nicht entschieden werden, ob die Blutzuckervermehrung lediglich ein alimentär glykosurisches Phänomen ist.

III. Beobachtungen bei Stopffütterung.

Wenn man einem nüchternen Hunde mit einer permanenten Magenfistel (Metallkanüle) ein Pfund *Fleisch* in den Magen durch die Fistel einführt, nimmt die *Trockensubstanz* des Blutes im allgemeinen, öfters mit gewissen Schwankungen ab; gegen Ende der dritten Stunde nach der Fütterung sieht man gelegentlich auch wieder einen Anstieg.

Bei der Stopffütterung mit dem *Kohlehydratbrei* verhält sich die *Bluttrockensubstanz* in ungefähr derselben Weise.

Bei der Stopffütterung mit *Fett* nimmt die *Trockensubstanz* ziemlich kontinuierlich zu, oder nur vorübergehend zu, oder bleibt unverändert. Eine Abnahme der Trockensubstanz kommt nur ausnahmsweise vor.

Bei der Stopffütterung mit *Fleisch* nimmt der *NaCl-Gehalt* des Serums, auf das frische Blut wie auch auf die Trockensubstanz berechnet, meistens leicht zu, manchmal bleibt er auch unverändert.

Bei der Stopffütterung mit *Kohlehydrat* haben wir hinsichtlich des *NaCl-Gehalts* des Serums das gleiche Verhalten wie bei der Fleischfütterung.

Bei der Stopffütterung mit *Fett* bleibt der *NaCl-Gehalt* des Blutes im wesentlichen unverändert.

Der *Blutzucker* bleibt sowohl bei Stopffütterung mit *Fleisch*, wie auch mit *Kohlehydrat*, auf das frische Blut berechnet, unverändert, auf die Trockensubstanz berechnet, aber nimmt er zu. Bei der Stopffütterung mit *Fett* bleibt er bei Schwankungen unverändert, gelegentlich nimmt er, auf die Trockensubstanz berechnet, auch etwas ab.

Das Ergebnis dieser Versuche ist, daß sich die Bluttrockensubstanz, wie der NaCl- und Zuckergehalt des Blutes bei der Stopffütterung prinzipiell genau so verhalten, wie bei der Normalfütterung.

IV. Beobachtungen bei Scheinfütterung.

Die Scheinfütterung der ösophagotomierten Magenfistelhunde wurde nur mit Fleisch vorgenommen. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Normalfütterung und Stopffütterung floß bei der Scheinfütterung der produzierte Magensaft aus der Magenfistel nach außen ab.

Bei der Scheinfütterung nimmt die *Bluttrockensubstanz* entweder ab oder bleibt unverändert. Es verhält sich also die Trockensubstanz hier ganz ähnlich wie bei den Versuchen mit Normalfütterung oder Stopffütterung, bei denen der gebildete Magensaft nicht, wie bei den Scheinfütterungsversuchen, aus dem Körper ausfloß. Wenn in den ersten 3 Stunden der Verdauung abgesonderte Verdauungssäfte, oder auch Wasser aus den Speisen in nennenswerter Weise bei meinen Ver-

suchen resorbiert worden wären und die Wasserresorption einen entscheidenden Einfluß auf den Trockensubstanzgehalt des Blutes gehabt hätte, dann hätte bei den Scheinfütterungsversuchen mit abfließendem Magensaft dieses Moment für die Verdünnung des Blutes, soweit der Magensaft dabei in Frage kommt, gefehlt. Darum ist vielleicht die Abnahme der Bluttrockensubstanz beim Scheinfütterungsversuch geringer als bei den Versuchen mit Normalfütterung oder Stopffütterung. Ein prinzipieller Unterschied besteht aber wohl nicht zwischen den beiden Versuchskategorien. Das zeigt sich auch beim Chlor- und Zuckergehalt des Blutes. Der Chlorgehalt bleibt bei der Scheinfütterung ziemlich unverändert, sinkt manchmal oder steigt auch leicht an.

Als Ergebnis dieser Versuche können wir also buchen, daß bei der Scheinfütterung mit Fleisch, ebenso wie bei der Normal- und Stopffütterung mit Fleisch sich ein Wasserstrom aus den Geweben ins Blut ergießt, und daß auch das bei der Sekretion aus dem Blute genommene Kochsalz sofort wieder ersetzt wird, ohne daß es allerdings zu einer nennenswerten Überkompensation zu kommen scheint. (Weniger intensive Reflexwirkung von der rezeptorischen Schleimbauoberfläche aus bei der Scheinfütterung, als bei einer Fütterung mit Anfüllung des Magens?)

Schlußbetrachtungen.

Das wesentliche Ergebnis der vorstehend mitgeteilten Versuche am Hunde ist folgendes. Einerlei, wie die Magensaftsekretion und damit auch die Sekretion der anderen Verdauungsdrüsen durch Fütterung hervorgerufen wird, ob durch eine normale Fütterung, eine Stopffütterung oder Scheinfütterung, immer spielen sich in den ersten 3 Stunden nach der Fütterung folgende Veränderungen ab, vorausgesetzt, daß durch die Fütterung eine starke Sekretion ausgelöst wird: das Blut wird verdünnt, der Kochsalzgehalt hat bei der Normalfütterung und Stopffütterung in der Mehrheit der Fälle die Neigung, anzusteigen, bei der Scheinfütterung aber die Neigung, unverändert zu bleiben, der Zuckergehalt zeigt keine eindeutigen, mit der Sekretion der Magendrüsen zusammenhängende Veränderungen.

Ist die Sekretion aber schwach, wie bei der Fettfütterung, so zeigen alle diese Faktoren die Neigung, einen Verlauf in umgekehrter Richtung zu nehmen.

Die Blutverdünnung, die Steigerung des Blutkochsalzgehaltes weisen eindeutig auf einen *mit der Sekretion der Verdauungsdrüsen parallel gehenden kompensatorischen oder überkompensatorischen Vorgang in den Geweben* hin, als dessen Folge Wasser und Kochsalz, und zwar letzteres wohl auch aus seinen festen Gewebsdepots dem Blute zuströmen.

Der Magensaft des Hundes ist chlorreicher als der des Menschen. Der erstere enthält etwa 5 bis 5,2 Prom., der letztere nur etwa 4 bis 4,2 Prom. Salzsäure. So ist also auch das Chlorbedürfnis der Magendrüsen selbst bei gleicher Sekretmenge beim Hunde größer als beim Menschen. Andererseits ist zwischen Mensch und Hund kein wesentlicher Unterschied im NaCl-Gehalt des Blutes. Er liegt in beiden Fällen bei etwa 0,50 Proz. Wenn aber der menschliche Magen unter pathologischen Verhältnissen abnorm große Saftmengen bei ungefähr normaler Säurekonzentration produziert, wie es nach *Bickel* (8) wohl durchgängig bei allen Fällen von Hyperchlorhydrie beim Menschen zutrifft, dann hat auch die menschliche Magendrüse ein gesteigertes Chlorbedürfnis, das sich unter diesen Umständen demjenigen nähert, das die Drüse des Hundes schon unter normalen Verhältnissen aufweist. Es müßte sich nach alledem auch der Blutchemismus bei der Sekretion beim Hunde in der Norm so verhalten, wie beim Menschen in dem Zustande der Supersekretion oder, was dasselbe besagt, der Hyperchlorhydrie, und zwar gerade im Hinblick darauf, daß der Blutkochsalzgehalt beim Hunde und Menschen die gleichen Normalwerte aufweist.

Umgekehrt müßte sich der Blutchemismus während der Sekretion beim Hunde unter dem Eindruck einer schwachen Sekretion, wie es z. B. nach Fettnahrung der Fall ist, ähnlich demjenigen beim Menschen unter normalen Sekretionszuständen verhalten.

Daß diese Schlußfolgerungen zuzutreffen scheinen, geht aus einem Vergleich meiner Versuchsresultate am Hunde mit denjenigen von *Boenheim* (7) am Menschen hervor. *Boenheim* sah den Chlorgehalt des Blutes bei normalen Menschen im Anschluß an die Hauptmahlzeit absinken, bei kranken Menschen mit Supersekretion aber ansteigen. Auf Grund dieser Beobachtungen hat *Boenheim* auch schon klar erkannt, daß die Größe der Chlormobilisation aus den Geweben abhängig ist von der Größe des Chlorbedarfs der Verdauungsdrüsen, und daß die Steigerung des Blutchlorgehalts bei gesteigerter Sekretion auf einer Hypermobilisation von Gewebschlor aus der Gewebsflüssigkeit und den festen Depots beruht. In diesen Fällen der Chlorvermehrung im Blute bei der verstärkten Tätigkeit der Verdauungsdrüsen wird gleichzeitig das überschüssig mobilisierte Chlor auch weiter durch den Harn ausgeschieden. Darum fand *Boenheim* beim magenkranken Menschen mit gesteigerter Sekretion in Anschluß an die Hauptmahlzeit die prozentige Kochsalzmenge im Harn, bezogen auf die 24stündige Gesamtmenge des Harns, vermehrt, beim gesunden aber vermindert.

Durch diese Beobachtungen am Harn lernen wir noch einen neuen Faktor kennen, der für die Einstellung des Blutchlorspiegels in den ersten Verdauungsphasen von Bedeutung ist, neben der Chloraus-

scheidung durch die Verdauungsdrüsen und der Chlormobilisation, nämlich die Chlorausscheidung durch den Harn.

Sie kann aber beim Hunde in der Norm gewöhnlich keine solche Größe erreichen, daß dadurch die überkompensatorische Chlormobilisation kompensiert oder gar der Chlorspiegel unter die Norm herabgedrückt wurde, weil in der überwiegenden Mehrzahl meiner Versuche bei starker Sekretion der Chlorgehalt des Blutes faktisch anwuchs.

Ich habe ferner in der Einleitung schon kurz darauf hingewiesen, daß alle meine Versuche angestellt wurden, nachdem die Tiere vorher 15 Stunden völlig nüchtern, d. h. ohne Speise und Trank gehalten worden waren. Am Tage vor dem Versuchstage bekam jedes Tier immer zwischen 3 und 4 Uhr nachmittags ein Pfund gehacktes Pferdefleisch, das sofort gefressen wurde, und gleichzeitig Wasser. Der Wassernapf blieb im Käfig bis 8 Uhr abends stehen, so daß das Tier nach Belieben trinken konnte. Dann wurde er entfernt, so daß also das Tier von 8 Uhr abends bis 11 Uhr vormittags am folgenden Tage bei absoluter Karenz gehalten wurde. Um 11 Uhr begann der Versuch. *Meine Tiere standen also bei allen Versuchen unter den gleichen Allgemeinbedingungen des Körpers, insbesondere war auch der Wassergehalt des Körpers immer ungefähr derselbe.* Wie weit diese Gleichmäßigkeit der allgemeinen Versuchsbedingungen bei den *Boenheim*schen Versuchen am Menschen gewährleistet war, kann ich nicht übersehen. Aber man muß doch immerhin daran denken, daß bei Verschiedenheiten in den allgemeinen Versuchsbedingungen auch Verschiedenheiten in Versuchsergebnissen zustande kommen können, und daß das gegensätzliche Verhalten des Blutchlors am normalen Hunde und am normalen Menschen bei diesen Versuchen auf einer Verschiedenheit in solchen allgemeinen Versuchsbedingungen zum Teil mit beruht.

Noch auf einige andere Untersuchungen will ich hier hinweisen, die mit meiner Arbeit in Verbindung stehen.

Biernacki (1) hatte gefunden, daß bei Ulcus ventriculi mit Hyperacidität im nüchternen Zustande bereits das Chlor im Serum und der Wassergehalt des Gesamtblutes vermindert seien.

W. Arnoldi (5) hatte im Durchschnitt im Serum des nüchternen Menschen folgende Chlorwerte festgestellt:

bei magengesunden Personen . . .	0,358	Proz.	Cl
„ Hyperacidität	0,3556	„	Cl
„ Anacidität	0,3723	„	Cl
„ wechselnder Sekretion	0,3630	„	Cl

Beim normalen Hunde fand *Arnoldi* ½ Stunde nach einer Fleischfütterung eine Verminderung des Chlorgehaltes im Blute von

0,04 Proz. Dazu ist zu bemerken, daß auch in meinen Versuchen sich oft am Ende der ersten halben Stunde eine leichte Verminderung des Chlors zeigte, daß aber in der Folgezeit dann die Steigerung nachfolgte.

Wenn man die *Boenheim*schen, *Arnoldi*schen und *Biernacki*schen Chlor- bzw. Kochsalzwerte des Serums bei magengesunden Menschen und solchen mit Hyperacidität, wie Anacidität im nüchternen Zustande vergleicht, dann findet man, daß ebensowenig eine gute Übereinstimmung in den Resultaten der verschiedenen Untersucher, wie auch innerhalb der Beobachtungsreihen eines Untersuchers bestehen.

Boenheim fand bei Superacidität die Chlorwerte meistens erhöht, aber auch normal, oder herabgesetzt. Bei Anacidität fand er dagegen die Werte oft recht niedrig. *Arnoldis* Zahlen schwanken ebenfalls, aber er erhielt bei Superacidität im Durchschnitt einen leicht verringerten, bei Anacidität einen leicht gesteigerten Wert. *Biernacki* endlich beobachtete bei Superacidität eine Verminderung des Chlorgehalts.

Man wird nicht fehlgehen, wenn man angesichts dieser Sachlage die Meinung ausspricht, daß bei den verschiedenen Sekretionsstörungen des Magens die Nüchternchlorwerte des Serums kein so typisches Verhalten zeigen, daß sie etwa pathogenetisch mit der Sekretionsstörung als Ursache der letzteren in Zusammenhang gebracht werden können.

Darin aber stimmen die Beobachtungen am Menschen mit meinen Beobachtungen am Hunde überein, *daß im allgemeinen mit* einer Vermehrung des Chlors im Blute auch eine Steigerung im Wassergehalt desselben eintritt.

Methodisch ist zu allen diesen Versuchen noch zu sagen, daß nur diejenigen Versuche verläßliche Resultate ergeben, bei denen zum Zwecke der Chloranalyse keine größeren Aderlasse den Versuchsindividuen, und erst recht keine wiederholten Aderlässe in kürzeren Intervallen gemacht wurden. Denn der Aderlaß als solcher bewirkt schon eine Steigerung des Blutchlors. Darum eignet sich für solche Untersuchungen die *Bang*sche Mikromethode am meisten. Diesen Einwand kann man z. B. gegen die Beobachtungen von *Viola* (2) machen, der 2½ Stunden nach der Nahrungsaufnahme eine Steigerung des Chlorgehalts im Blute fand, wie ich sie allerdings auch in einer Reihe meiner Versuche unter Anwendung der Mikromethode nachweisen konnte. Demgegenüber fanden allerdings *Benrath* und *Sachs* (3) nach Anregung der Salzsäuresekretion eine Verminderung des Blutchlors um 0,01 bis 0,03 Proz.

Meine Kurven und Tabellen zeigen, daß im Anschluß an eine Fleischfütterung, also bei starker Sekretion, bei einem magengesunden Individuum, wenn man bei halbstündigen Intervallen fortlaufend den Kochsalzgehalt des Serums untersucht und die Analysenresultate in Kurven aufzeichnet, daß dann eine solche Kurve sehr gewöhnlich

unter Schwankungen verläuft, die bei den verschiedenen Versuchen sehr verschiedenartig sein können, daß man also nur von einer allgemeinen Tendenz sprechen kann, die eine solche Kurve im Sinne eines Ansteigens oder Abfallens unter unregelmäßig auftretenden Stillständen und Remissionen nimmt.

Man kann also gar nicht erwarten, daß auch bei gleicher Versuchsanordnung und bei einer Beobachtung zur gleichen Zeit immer übereinstimmende Resultate gefunden werden. Die Remissionen im Verlauf der einzelnen Kurven erklären sich ungezwungen aus den teils gegensätzlichen Vorgängen, die sich in einer Sekretionsperiode abspielen, und die im wesentlichen gipfeln in dem Kochsalz- und Wasserentzug des Blutes durch die Drüsen und die Nieren und dem Nachströmen von Kochsalz und Wasser ins Blut aus den Geweben.

Daß die stärkeren Magensafterreger auch eine stärkere Flüssigkeitsverschiebung innerhalb des Körpers verursachen, hat auch *Arnoldi* am Menschen feststellen können.

Endlich sei erwähnt, daß *London* (10) kürzlich Beobachtungen mitgeteilt hat, aus denen sich ergibt, daß bei der Verdauung in dem Blut aus den verschiedensten Gefäßprovinzen Schwankungen im Wassergehalt auftreten.

Literatur.

1) *Biernacki*, Untersuchungen über die chemische Blutbeschaffenheit bei pathologischen, insbesondere bei anämischen Zuständen. Zeitschr. f. klin. Med. **24**, 460, 1894. — 2) *Viola*, zitiert nach *Hamburger*, Osmot. Druck **1**, 503, 1902. — 3) *Benrath* und *Sachs*, Über die Bildung der Salzsäure im Magen. Arch. f. Physiol. **109**, 466, 1905. — 4) *Rosemann*, Die Eigenschaften und Zusammensetzung des durch Scheinfütterung gewonnenen Hundemagensaftes. Pflügers Arch. **118**, 467, 1907. — 5) *W. Arnoldi*, Über Änderungen im Chlorgehalt des Blutserums bei Sekretionsstörungen des Magens. Zeitschr. f. klin. Med. **76**, H. 1 u. 2. — 6) *Derselbe*, Der prozentische Chlorgehalt des Blutserums bei kochsalzarmer und kochsalzreicher fleischfreier Ernährung sowie bei verschiedener Flüssigkeitszufuhr. Berl. klin. Wochenschrift 1913, Nr. 15. — 7) *Boenheim*, Beitrag zur Kenntnis des Chlorstoffwechsels I und II. Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **12**, 1921. — 8) *A. Bickel*, Magensaft. Handb. d. Biochem. d. Menschen u. d. Tiere von *Oppenheimer*. 2. Aufl., **4**, 1924. Die Chemie der Supersekretion. Diese Zeitschr. **1**. — 9) *W. Arnoldi*, Veränderungen des Blutes nach Nahrungsaufnahme. Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Ther. **21**, H. 1. 10) *E. S. London* u. Mitarbeiter, Zur Kenntnis des intermediären Stoffwechsels. Pflügers Archiv **205**, 1924.

Experimenteller Teil.

Protokolle.

Nr.		Minuten	Trockensubstanz im Blut Proz.	NaCl im Blut Proz.	NaCl pro 100 Trockensubstanz Proz.	Blutzuckergehalt Proz.	Blutzucker pro 100 Trockensubstanz Proz.
1	23. X. Hund Nr. 4. Nüchternzustand	0	19,8	0,502	2,53	—	—
		30	19,8	0,501	2,53	—	—
		60	19,6	0,504	2,57	—	—
		90	19,8	0,504	2,54	—	—
		120	19,7	0,500	2,53	—	—
		150	19,7	0,502	2,54	—	—
		180	19,5	0,497	2,54	—	—
2	25. X. Hund Nr. 5. Normalfütterung mit Fleisch	0	21,3	0,460	2,15	—	—
		30	21,0	0,486	2,32	—	—
		60	21,0	0,502	2,34	—	—
		90	21,0	0,477	2,27	—	—
		120	20,7	0,500	2,41	—	—
		150	19,3	0,505	2,61	—	—
		180	20,0	0,531	2,65	—	—
3	24. VII. Hund Nr 1. Normalfütterung mit Fleisch	0	15,9	0,502	3,17	0,080	0,510
		30	15,4	0,492	3,17	0,074	0,477
		60	15,3	0,508	3,32	0,075	0,490
		90	15,9	0,495	3,11	0,089	0,559
		120	15,3	0,496	3,24	0,101	0,660
		150	14,3	0,498	3,48	0,088	0,615
4	4. VIII. Hund Nr. 2. Normalfütterung mit Fleisch	0	17,1	0,521	3,02	0,077	0,445
		30	18,5	0,504	2,72	0,081	0,437
		60	17,6	0,521	2,96	0,084	0,473
		90	15,9	0,531	3,33	0,085	0,534
		120	15,5	0,524	3,38	0,082	0,529
		150	16,4	0,532	3,24	0,072	0,439
		180	16,2	0,547	3,37	0,084	0,518
5	12. VIII. Hund Nr. 2. Normalfütterung mit Fleisch	0	18,0	0,483	2,68	0,072	0,402
		30	18,0	0,472	2,62	0,064	0,355
		60	18,6	0,496	2,66	0,088	0,473
		90	18,2	0,537	2,95	0,085	0,466
		120	18,1	0,530	2,92	0,084	0,464
		150	17,1	0,531	3,10	0,086	0,502
		180	17,2	0,549	3,19	0,084	0,488
6	1. IX. Hund Nr. 3. Normalfütterung mit Fleisch	0	22,3	0,509	2,28	0,074	0,331
		30	22,2	0,503	2,26	0,091	0,409
		60	20,9	0,527	2,52	0,084	0,401
		90	20,6	0,551	2,65	0,088	0,427
		120	20,0	0,543	2,71	0,082	0,410
		150	20,8	0,554	2,66	0,081	0,389
		180	20,7	0,559	2,70	0,088	0,425
7	26. VII. Hund Nr. 1. Normalfütterung mit Kohlehydratbrei	0	15,9	0,502	3,15	0,082	0,515
		30	17,1	0,508	2,97	0,092	0,538
		60	15,5	0,492	3,17	0,129	0,832
		90	16,8	0,495	2,94	0,118	0,702
		120	15,9	0,499	3,13	0,119	0,748
		150	14,8	0,497	3,35	0,097	0,855

Nr.		Minuten	Trockensubstanz im Blut Proz.	Na Cl im Blut Proz.	Na Cl pro 100 Trockensubstanz Proz.	Blutzuckergehalt Proz.	Blutzucker pro 100 Trockensubstanz Proz.
8	15. VIII. Hund Nr 2. Normalfütterung mit Kohlehydratbrei	0	16,5	0,528	3,19	0,079	0,481
		30	17,7	0,517	2,92	0,085	0,480
		60	16,4	0,523	3,18	0,094	0,573
		90	17,1	0,500	2,92	0,089	0,520
		120	16,1	0,513	3,18	0,094	0,583
		150	15,6	0,521	3,33	0,081	0,519
		180	15,6	0,521	3,33	0,062	0,397
9	5. IX. Hund Nr. 3. Normalfütterung mit Kohlehydratbrei	0	20,1	0,593	2,95	0,100	0,497
		30	19,8	0,582	2,93	0,159	0,803
		60	19,7	0,576	2,92	0,173	0,878
		90	20,7	0,594	2,95	0,163	0,810
		120	19,4	0,590	3,06	0,153	0,788
		150	19,8	0,548	2,76	0,127	0,641
		180	19,2	0,562	2,92	0,123	0,640
10	11. VII. Hund Nr. 1. Normalfütterung m t Margarine	0	16,8	0,568	3,37	0,071	0,425
		30	17,4	0,556	3,19	0,083	0,477
		60	18,4	0,511	2,77	0,070	0,380
		90	17,8	0,535	3,00	0,070	0,393
		120	18,2	0,546	3,00	0,075	0,412
		150	17,9	0,538	3,05	0,066	0,357
11	14. VII. Hund Nr. 1. Normalfütterung mit Margarine	0	16,8	0,550	3,26	0,075	0,448
		30	17,6	0,527	2,99	0,092	0,522
		60	17,8	0,508	2,85	0,078	0,438
		90	17,8	0,522	2,83	0,079	0,443
		120	18,5	0,532	2,87	0,081	0,437
		150	17,0	0,498	2,92	0,063	0,370
12	3. IX. Hund Nr. 2. Normalfütterung mit Margarine	0	20,2	0,530	2,64	0,085	0,420
		30	21,5	0,538	2,50	0,081	0,376
		60	21,3	0,543	2,53	0,086	0,403
		90	20,6	0,555	2,69	0,085	0,412
		120	19,8	0,542	2,73	0,083	0,419
		150	20,9	0,544	2,60	0,075	0,358
		180	20,4	0,549	2,69	0,089	0,436
13	27. X. Hund Nr. 5. Stopffütterung mit Fleisch	0	20,7	0,467	2,25	—	—
		30	19,2	0,478	2,48	—	—
		60	19,7	0,493	2,50	—	—
		90	18,6	0,512	2,75	—	—
		120	19,7	0,510	2,58	—	—
		150	19,5	0,515	2,64	—	—
		180	19,7	0,534	2,71	—	—
14	17. X. Hund Nr. 4. Stopffütterung mit Fleisch	0	18,5	0,496	2,68	—	—
		30	18,5	0,492	2,66	—	—
		60	17,6	0,504	2,86	—	—
		90	17,6	0,519	2,92	—	—
		120	17,9	0,524	2,92	—	—
		150	18,6	0,523	2,81	—	—
		180	16,8	0,523	3,11	—	—

Nr.		Minuten	Trockensubstanz im Blut Proz.	NaCl im Blut Proz.	NaCl pro 100 Trockensubstanz Proz.	Blutzuckergehalt Proz.	Blutzucker pro 100 Trockensubstanz Proz.
15	18. VIII. Hund Nr. 2. Stopffütterung mit Fleisch	0	18,9	0,544	2,87	0,081	0,430
		30	19,1	0,520	2,72	0,087	0,455
		60	19,2	0,536	2,73	0,087	0,453
		90	18,4	0,545	2,96	0,100	0,543
		120	18,2	0,541	2,97	0,092	0,505
		150	20,0	0,550	2,75	0,086	0,430
		180	18,6	0,558	3,00	0,080	0,430
16	8. IX. Hund Nr. 3. Stopffütterung mit Fleisch	0	18,6	0,535	2,87	0,058	0,311
		30	18,2	0,554	3,04	0,074	0,406
		60	18,4	0,548	2,97	0,072	0,392
		90	18,0	0,555	3,05	0,067	0,316
		120	18,8	0,598	3,18	0,067	0,356
		150	20,3	0,572	2,81	0,055	0,270
		180	19,4	0,573	2,95	0,057	0,293
17	7. VII. Hund Nr. 1. Stopffütterung mit Kohlehydratbrei	0	16,7	0,543	3,27	0,083	0,498
		30	17,2	0,520	3,02	0,094	0,546
		60	18,5	0,546	2,95	0,102	0,551
		90	16,3	0,522	3,20	0,080	0,490
		120	16,1	0,522	3,24	0,088	0,546
		150	15,4	0,534	3,46	0,068	0,441
18	20. VIII. Hund Nr. 2. Stopffütterung mit Kohlehydratbrei	0	18,0	0,552	3,06	0,093	0,518
		30	17,9	0,537	3,00	0,094	0,530
		60	17,1	0,539	3,15	0,108	0,631
		90	18,0	0,547	3,03	0,098	0,544
		120	16,0	0,555	3,46	0,098	0,612
		150	16,9	0,556	3,28	0,100	0,591
		180	17,0	0,551	3,24	0,116	0,682
19	16. VII. Hund Nr. 1. Stopffütterung mit Margarine	0	18,3	0,537	2,43	0,079	0,430
		30	18,5	0,528	2,85	0,084	0,454
		60	19,8	0,525	2,14	0,086	0,434
		90	19,3	0,540	2,79	0,092	0,476
		120	19,3	0,537	2,78	0,076	0,393
		150	17,8	0,528	2,96	0,076	0,426
20	22. VIII. Hund Nr. 2. Stopffütterung mit Margarine	0	18,0	0,514	2,85	0,085	0,473
		30	17,6	0,513	2,91	0,091	0,517
		60	17,6	0,505	2,86	0,087	0,494
		90	17,5	0,519	2,96	0,082	0,468
		120	17,4	0,497	2,85	0,077	0,442
		150	16,8	0,520	3,09	0,071	0,422
		180	16,8	0,506	3,01	0,090	0,535
21	12. IX. Hund Nr. 3. Stopffütterung mit Margarine	0	18,9	0,497	2,62	0,076	0,402
		30	18,8	0,498	2,64	0,088	0,468
		60	19,3	0,504	2,61	0,096	0,497
		90	19,2	0,494	2,57	0,086	0,447
		120	19,2	0,506	2,59	0,081	0,421
		150	19,7	0,493	2,50	0,078	0,395
		180	19,5	0,498	2,55	0,075	0,374

Nr.		Minuten	Trockensubstanz im Blut Proz.	NaCl im Blut Proz.	NaCl pro 100 Trockensubstanz Proz.	Blutzuckergehalt Proz.	Blutzucker pro 100 Trockensubstanz Proz.
22	28. IX. Hund Nr. 3. Scheinfütterung mit Fleisch	0	19,5	0,586	3,00	0,070	0,358
		30	19,8	0,587	2,70	0,072	0,331
		60	18,3	0,596	3,25	0,070	0,382
		90	19,7	0,596	3,02	0,080	0,406
		120	19,6	0,589	3,00	0,071	0,362
		150	19,9	0,587	2,94	0,064	0,321
23	31. X. Hund Nr. 5. Scheinfütterung mit Fleisch	0	24,6	0,512	2,08	—	—
		30	24,3	0,512	2,08	—	—
		60	24,4	0,531	2,17	—	—
		90	24,0	0,526	2,19	—	—
		120	23,8	0,521	2,18	—	—
		150	23,4	0,515	2,20	—	—
		180	24,0	0,544	2,28	—	—

Über einen neuen schwefelhaltigen Bestandteil der Hefe.

Von

U. Suzuki, S. Odake und **T. Mori.**

(Aus dem agrikulturchemischen Laboratorium der Universität Tokio.)

(Eingegangen am 24. November 1924.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Vor 10 Jahren hat der eine von uns (*U. Suzuki*) eine kristallinische Base aus dem alkoholischen Extrakt von Hefe isoliert. Diese Base bildete farblose Prismen vom Schmelzpunkt 208°; die wässerige Lösung reagierte fast neutral und hatte schwach bitteren Geschmack. Sie war durch Phosphorwolframsäure fällbar und bildete auch ein hellgelbes glänzendes Pikrat vom Schmelzpunkt 183°. Nach der Elementaranalyse hatten wir für diese Base die empirische Formel $C_9H_{12}N_4O_4$ vorgeschlagen[1]).

Die weitere Untersuchung der Base war längere Zeit unterbrochen. Vor kurzem haben wir diese Base wieder studiert und zu unserer Überraschung gefunden, daß *Schwefel* darin enthalten ist; deshalb mußten wir die früher vorgeschlagene Formel aufgeben. Die Base wurde jetzt in größeren Mengen dargestellt und nach sorgfältiger Reinigung wieder analysiert. Die Analyse stimmte nun auf die Formel $C_{11}H_{15}N_5O_3S$.

Wird diese Base mit 3proz. Salzsäure 1 Stunde auf 80° erhitzt, so wird sie leicht in *Adenin* ($C_5H_5N_5$) und einen *schwefelhaltigen Zucker von der Formel* $C_6H_{12}O_4S$ gespalten. Obwohl der letztgenannte Zucker noch nicht in freiem Zustande kristallinisch erhalten worden ist, so konnte man ihn doch als schön kristallisiertes Phenylosazon isolieren. Dieses Osazon hat den Schmelzpunkt 158 bis 159°, und die Analyse desselben stimmte mit der Formel $C_{18}H_{22}N_4O_2S$ =

$$\begin{array}{l} CH:N_2HC_6H_5 \\ | \\ C:N_2HC_6H_5 \\ | \\ CHOH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2-S-CH_3, \end{array}$$

[1]) Journ. Tokio Chem. Soc. **34**, 1134, 1914.

d. h. dem Phenylosazon eines Zuckers von der Formel

```
C6H12O4S = CHO
           |
           CHOH
           |
           CHOH
           |
           CHOH
           |
           CH2—S—CH3
```

vollkommen überein.

Die freie Base gibt eine schöne Pentosenreaktion mit Orcinsalzsäure, sie liefert auch deutlich Furfurol beim Kochen mit Salz- oder Schwefelsäure. Bei vorsichtigem Abdampfen mit Salpetersäure scheidet sich das salpetersaure Salz des Hypoxanthins aus, welches durch Oxydation des Adenins entstanden sein muß. Wenn man Spuren von Vanadiumoxyd zu der salpetersauren Lösung hinzugibt, so geht die Oxydation viel energischer vor sich und man erhält statt des Hypoxanthins das Xanthinnitrat. Schüttelt man die Mutterlauge des Hypoxanthins bzw. Xanthins mit Äther und dampft die ätherische Lösung ein, so scheidet sich Oxalsäure kristallinisch aus. Die von der Ätherschicht abgetrennte wässerige Lösung gibt bei Zusatz von $BaCl_2$ eine weiße Fällung von $BaSO_4$. Das beweist, daß die Schwefelsäure durch Oxydation von Schwefel entstanden ist; denn wenn die Base mit verdünnter Salzsäure gekocht und mit Chlorbariumlösung versetzt wird, so entsteht keine Fällung. Das besagt, daß der Schwefel nicht in Sulfatform vorhanden ist. Die Base zeigt in schwach alkalischer Lösung keine Nitroprussidreaktion; erst nach dem Kochen mit konzentriertem Alkali gibt sie eine tief rotviolette Färbung. Kocht man die Base mit verdünnter Salzsäure unter Zusatz von einem Stückchen Zink, so entwickelt sich ein starker und übler Geruch,

```
       N=C.NH2
       |  |           H  H  H  H  H
I.    HC  C—N————————C——C——C——C——C—S—CH3 = C11H15N5O3S.
       ||  ||   >CH  |OH  OH|    |
       N—C—N//       |——O———|    H
      \_____________/ \________________/
          Adenin       Thio-methyl-pentose

       N—C—NH2
       |  |           H  H  H  H  H
II.   HC  C—N————————C——C——C——C——C—CH3.
       ||  |    >CH  |  |   |  |  |
       N—C—N//       | OH   OH |  SH
                     |———O—————|

       N=C—NH2           ┌———O————┐
       |  |           H  | H  H   |
III.  HC  C—N————————C——C——C——C——C—CH2SH = C11H13N5O3S.
       ||  ||   >CH  |  H  OH|   H
       N—C—N//       |———O———|
```

welcher höchstwahrscheinlich auf Mercaptan oder Dimethylsulfid zu beziehen ist. Nach dieser Beobachtung nehmen wir an, daß diese Base eine *Verbindung des Adenins mit einer Thio-methyl-pentose* ist, und zwar gemäß einer der vorstehenden Strukturformeln.

Unter diesen drei Formeln ist Formel I am wahrscheinlichsten. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob diese Annahme richtig ist.

Das Vorkommen eines schwefelhaltigen Zuckers im Organismus ist bisher nicht bekannt; die Bindung desselben an Adenin ist zugleich biologisch sehr interessant, weil sie mit der Struktur des Adenosins (einer Verbindung des Adenins mit Ribose) große Ähnlichkeit hat.

Als schwefelhaltige Bestandteile des tierischen Organismus sind bisher Cystin, Cystein, Taurin und Taurocholsäure bekannt. Ferner bildet Chondroitinsäure einen wichtigen Bestandteil des Knorpels. Die Ätherschwefelsäuren des Harns sind als Stoffwechselprodukte des Schwefels anzusehen.

Im Pflanzenreich ist seit langem die Senfölgruppe ziemlich bekannt. Kürzlich hat *Neuberg* im Agar einen Kohlenhydrat-schwefelsäureester aufgefunden und *Tanret* ein Schwefelderivat des Histidinbetains, das Ergothionin, aus Mutterkorn isoliert. Ferner hat *J. H. Müller* über eine neue schwefelhaltige Aminosäure berichtet, die wahrscheinlich der Äthyläther des Cysteins ($C_2H_5-S-CH_2-CHNH_2-COOH$) ist[1]. Die Gehirnsubstanz der Tiere enthält auch nicht unbedeutende Mengen Schwefel, doch weiß man sehr wenig von den Verbindungsformen desselben, obwohl im allgemeinen angenommen wird, daß der Schwefel eine ebenso wichtige Rolle im Nervensystem spielt wie der Phosphor. Wir vermuten nun, daß die von uns isolierte schwefelhaltige Base auch eine Bedeutung im Zellhaushalt der Hefe hat.

Es sei hier noch erwähnt, daß der alkoholische Extrakt der Reiskleie in 20proz. alkoholischer Lösung nach langem Stehen allmählich einen amorphen Niederschlag abscheidet. *B. Suzuki* hat neuerdings diesen Niederschlag untersucht und bestätigt, daß er stark beschleunigende Wirkung auf das Wachstum der Hefe hat, obwohl er keine antineuritische Wirkung auf Tauben besitzt[2]. Wir haben nun gefunden, daß dieser Niederschlag nach sorgfältiger Reinigung etwa 1,4 Proz. Schwefel enthält. Das Roh-oryzanin, welches aus alkoholischen Extrakten der Hefe mittels des Phosphorwolframsäureverfahrens dargestellt wurde, enthielt auch ungefähr 1 Proz. S. Obgleich der Schwefelgehalt in Oryzaninpräparaten mit der Reinigung immer geringer wird, ist es doch eine interessante Tatsache, daß der Schwefel als Begleitstoff des Oryzanins nicht nur in der Hefe, sondern auch in der Reiskleie vorhanden ist.

---

[1]) *J. H. Müller*, Journ. of. biol. Chem. **56**, 157, 1923.
[2]) Journ. Chem. Soc. Japan. 1924.

Ob es sich in beiden Fällen um dieselbe Verbindung handelt, muß weiter untersucht werden.

Darstellung der schwefelhaltigen Base.

1. Zur Darstellung der Base wurde der alkoholische Extrakt der Hefe im Vakuum eingedampft; der zurückgebliebene Sirup wurde in wenig Wasser gelöst und mit einer konzentrierten Tanninlösung gefällt. Der dadurch entstandene Niederschlag wurde mit Barytwasser verrieben und abgesaugt. Das Filtrat wurde nach Entfernen des Baryts im Vakuum eingedampft und mit 50proz. Aceton verrieben. Die vom unlöslichen Anteil abfiltrierte Flüssigkeit gab nach dem Eindampfen einen dunkelbraunen Sirup, welcher starke antineuritische Wirkung hatte. Aus diesem Sirup schieden sich nach mehrere Wochen langem Aufbewahren farblose Kristalle aus, welche abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und aus heißem Wasser umkristallisiert wurden. Sie bestehen aus langen farblosen Prismen. Im Kapillarrohr erhitzt, schmelzen sie bei 208^0 (unkorrigiert) unter Zersetzung. Da von der Firma Sankyo & Co. das Rohoryzanin in oben beschriebener Weise in großen Mengen dargestellt wird, so konnte man diese Base als Nebenprodukte des Oryzanins nach und nach sammeln. Wir haben etwa 1 kg unreiner Base, die aus mehreren tausend Kilogrammen Hefe dargestellt worden ist, von der Firma Sankyo erhalten und haben 400 g reines Präparat davon dargestellt.

2. Eine andere Methode ist folgende:

Der alkoholische Extrakt der Hefe wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt. Die Lösung der freien Basen, die aus diesem Niederschlag in gewohnter Weise dargestellt war, wurde mit Schwefelsäure neutralisiert, zum Sirup eingedampft und mit 85proz. Alkohol warm extrahiert. Der Auszug wurde nach dem Vertreiben des Alkohols in wenig Wasser gelöst, mit Salpetersäure schwach angesäuert und mit Silbernitrat gefällt. Der Silberniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt und die vom Schwefelsilber abfiltrierte Lösung wurde zum hellbraunen Sirup eingedampft. Hierauf wurde dieser in wenig Wasser gelöst und mit einem Überschuß von Kupferoxyd erwärmt. Nach dem Erkalten filtrierte man ab, das Filtrat wurde nach Entfernung des Kupfers durch Schwefelwasserstoff wieder zum hellbraunen Sirup eingedampft. Man löste den Sirup in wenig warmem Alkohol und setzte Pikrinsäure zu. Nach dem Erkalten der Lösung schied sich das Pikrat der schwefelhaltigen Base in hellgelben glänzenden Tafeln aus. Nach Umkristallisation schmolz es bei 183^0. Die Ausbeute betrug etwa 0,5 g aus 8 g Roh-oryzanin. Aus diesem Pikrat kann man die freie Base in bekannter Weise darstellen.

Analysen der schwefelhaltigen Base.

Zur Analyse wurde die Base zweimal aus heißem Wasser umkristallisiert und im Vakuum bei 100° getrocknet.

1. 0,0917 g Substanz (mit CuO verbrannt) 0,1482 g CO_2, 0,0385 g H_2O.
   0,1137 g „ 23,4 ccm N (17°, 752 mm):
   C = 44,07, H = 4,66, N = 23,52.
2. 0,1047 g (mit CuO verbrannt), 0,1685 g CO_2, 0,0466 h H_2O.
   0,0490 g 9,8 ccm N (16,5°, 761 mm):
   C = 43,89. H = 4,98, N = 23,18.
3. 0,1558 g (mit Bleichromat verbrannt), 0,2540 g CO_2, 0,0741 g H_2O.
   C = 44,46, H = 5,28.
   0,1524 g (mit Bleichromat verbrannt), 0,2481 g CO_2, 0,0716 g H_2O:
   C = 44,40, H = 5,25.

Zur Bestimmung des Schwefels wurde die Substanz im Einschlußrohr mit konzentrierter Salpetersäure 10 Stunden auf 180° erhitzt. Nach dem Öffnen des Rohres wurde vorsichtig eingedampft, mit Wasser stark verdünnt und mit $BaCl_2$ gefällt.

4. 0,150 g Substanz 0,1206 g $BaSO_4$ = 0,016561 g S; S = 11,04 Proz.
   0,150 g „ 0,1208 g $BaSO_4$ = 0,016588 g S; S = 11,05 „ .

	C	H	N	S
Gefunden 1	44,07	4,66	23,52	—
2	43,89	4,98	23,18	—
3	44,46	5,28	—	11,04
4	44,40	5,25	—	11,05
Berechnet: als $C_{11}H_{15}N_5O_3S$ . .	44,44	5,00	23,55	10,78
als $C_{11}H_{13}N_5O_3S$ . .	44,74	4,40	23,73	10,85

Die Analysen stimmen also besser zu $C_{11}H_{15}N_5O_3S$ als für $C_{11}H_{13}N_5O_3S$.

Das Pikrat der Base.

Löst man die freie Base in Eisessig und gibt eine wässerige Pikrinsäurelösung hinzu, so entsteht sofort ein hellgelber Niederschlag, welcher beim Umlösen aus heißem Wasser als glänzende Tafeln oder manchmal als feine Nadeln auskristallisiert. Das Pikrat schmilzt im Kapillarrohr bei 183° unter Zersetzung. Zur Analyse wurde es im Vakuum bei 80° getrocknet.

0,0700 g	Substanz:	13,4 ccm N (25°, 764 mm);	N = 21,47 Proz.
0,0700 g	„	13,0 „ N (22°, 767 „);	N = 21,25 „
0,0700 g	„	13,4 „ N (25°, 761 „);	N = 21,39 „
0,1521 g	„	0,2151 g CO_2, 0,0506 g H_2O;	C = 38,57 Proz.
			H = 3,69 „
0,1426 g	„	0,0600 g $BaSO_4$;	S = 5,77 „
0,1772 g	„	0,0772 g $BaSO_4$;	S = 5,98 „
0.1960 g	„	0,0848 g $BaSO_4$;	S = 5,94 „

	C	H	N	S	Pikrinsäure
Gefunden 1	38,57	3,69	21,47	5,77	—
2	—	—	21,25	5,98	—
3	—	—	21,39	5,94	—
Berechnet: $(C_{11}H_{15}N_5SO_3)(C_6H_3N_3O_7)$	38,78	3,42	21,29	6,08	43,54

Man gelangt zu demselben Pikrat, wenn man die wässerige Lösung der freien Base mit Pikrinsäure erwärmt. In diesem Falle erhält man aber noch ein anderes Pikrat von niedrigerem Schmelzpunkt, in welchem je 1 Mol. Pikrinsäure mit 2 Mol. Base verbunden ist. Durch fraktionierte Kristallisation aus heißem Wasser kann man beide Pikrate voneinander trennen.

Die Analyse des zweiten Pikrats gab folgendes Resultat:

0,1540 g Substanz: 0,2313 g CO_2, 0,0586 g H_2O; C = 40,96 Proz.,
H = 4,23 „
0,1548 g „ 0,2314 g CO_2, 0,0585 g H_2O; C = 40,77 „
H = 4,20 „
0,0809 g „ 16,1 ccm N (24°, 752 mm); N = 21,95. „
0,1286 g „ 23,7 „ N (11°, 756 „); N = 21,82 „ .

	C	H	N	S	Pikrinsäure
Gefunden 1	40,96	4,23	21,95	—	—
2	40,77	4,20	21,85	—	—
Berechnet: $(C_{11}H_{15}N_5SO_3)_2(C_6H_3N_3O_7)$	40,82	4,08	22,11	7,78	27,82

Eigenschaften der freien Base.

1. Die freie Base besteht aus farblosen, schwach perlmutterglänzenden Prismen. Sie ist in kaltem Wasser schwer, in warmem Wasser sowie in Säuren und Alkalien leichter löslich. In Alkohol und Äther löst sie sich nicht.

2. Die wässerige Lösung reagiert fast neutral und bildet kein Kupfersalz. Sie gibt weder Triketohydrindenreaktion noch *Millon*sche Reaktion. Durch Quecksilbernitrat oder Jodjodkalium wird sie nicht gefällt. Eisenchlorid verursacht eine schwache Braunfärbung, aber keine Fällung. Phosphorwolframsäure gibt in saurer Lösung einen weißen, flockigen Niederschlag, welcher allmählich zusammenschrumpft und sich zu Boden setzt. Durch wässeriges Platinchlorid entsteht sofort eine Fällung, welche in Alkohol und Wasser fast unlöslich ist. Phosphormolybdänsäure gibt einen weißlichgrünen Niederschlag, der sich in Ammoniak klar löst, ohne Blaufärbung anzunehmen.

3. Die *Folin*sche Probe sowie die Diazoreaktion ist negativ.

4. Die Substanz gibt deútliche Pentosereaktion mit *Bial*schem Reagens. (*Bial*sches Reagens wird bereitet, indem man 2 g Orcin in 100 ccm 20proz. Salzsäure löst und dazu 10 bis 20 Tropfen 10proz. Eisenchlorid zugibt.) Erhitzt man die freie Base einige Minuten mit einigen Kubikzentimetern *Bial*schen Reagenzes, so entsteht eine blaugrüne Färbung. Schüttelt man jetzt mit Amylalkohol aus, so geht die Farbe in letzteren über.

5. Mit alkoholischem Phloroglucin und starker Salzsäure vorsichtig erwärmt, gibt die Base eine schöne rotviolette Färbung.

6. Mit α-Naphthol und konzentrierter Schwefelsäure entsteht keine rote Färbung.

7. Kocht man die Base kurze Zeit mit 20proz: Schwefelsäure, so entwickelt sich Furfurol (oder Methylfurfurol ?), wie durch Rotfärbung von Anilinacetatpapier leicht nachgewiesen werden kann.

8. Ferri-ferricyanidreagens ($FeCl_3 + K_3FeCy_6$ + Essigsäure) gibt zuerst nur schwach blaue Färbung. Beim Stehen wird die Farbe allmählich stärker, bis endlich ein blauer Niederschlag auftritt.

9. Schwefelreaktion: a) Mit konzentriertem Alkali erhitzt und mit Bleiessiglösung versetzt, entsteht eine schwarze Fällung von Bleisulfid. Verdünnt man die alkalische Flüssigkeit und gibt eine frische Nitroprussidnatriumlösung zu, so entsteht sofort eine tiefrote Färbung.

b) Wenn die freie Base oder das Pikrat derselben mit einem Stückchen metallischen Natriums geglüht und der Glührückstand in Wasser gelöst wird, so gibt seine filtrierte Lösung eine schwarze Fällung mit Bleiessig oder rote Färbung mit Nitroprussidnatrium.

c) Wenn die freie Base mit Soda-Salpeter geschmolzen, dann in Wasser gelöst, mit verdünnter Salzsäure angesäuert und mit Bariumchloridlösung versetzt wird, so entsteht ein weißer Niederschlag von $BaSO_4$. Wenn man aber die Base mit verdünnter Salzsäure 1 bis 2 Stunden erhitzt und mit Bariumchlorid versetzt, so erhält man keine Fällung. Also sieht man, daß der Schwefel in der Base nicht in Schwefelsäureform zugegen ist.

Die Base direkt in kaltem verdünnten Alkali gelöst, gibt keine Nitroprussidreaktion. Erst nach dem Kochen mit verdünnten Säuren oder Alkalien tritt die Probe ein.

10. Adeninreaktion: Wird die Base in 3proz. Salzsäure gelöst und mit einem Stückchen Zink auf dem Wasserbade erhitzt, so entsteht nach 20 Minuten vorübergehende rotviolette Färbung, welche später wieder verschwindet. Zugleich beobachtet man die Entwicklung eines stark riechenden Gases. Wenn dieses Gas in eine wässerige Lösung von Quecksilbernitrat oder Quecksilberchlorid eingeleitet wird, entsteht eine weiße Fällung, die wahrscheinlich aus einer Quecksilberverbindung des Mercaptans oder des Dimethylsulfids besteht.

Hydrolyse der freien Base.

Zu diesem Zwecke wurden 2 g der Base mit 20 ccm 3proz. Salzsäure 1 Stunde auf 80⁰ erhitzt. Die anfangs farblose Flüssigkeit wurde dabei allmählich gelbbraun. Man kühlte nun ab und setzte Phosphorwolframsäure zu, bis keine Fällung mehr entstand. Der dadurch entstandene Niederschlag wurde mit Baryt verrieben und abgesaugt. Das Filtrat wurde nach dem Entfernen des Baryts mit Schwefelsäure im Vakuum eingedampft. Es schieden sich weiße Kristalle in reichlicher Menge aus, welche, aus heißem Wasser umkristallisiert, als *Adenin* identifiziert wurden. Beim Erhitzen mit Zink und Salzsäure gab es die charakteristische rote Färbung. Es bildete auch das schwer lösliche Pikrat. Die Ausbeute an Adenin betrug 38,4 Proz. der freien Base, was etwa 80 Proz. der Theorie entspricht, vorausgesetzt, daß 1 Mol. Adenin ($C_5H_5N_5$) aus 1 Mol. der Base $C_{11}H_{15}N_5O_3S$ abgespalten wird.

Analyse des Adenins.

Zur Analyse wurde das Adenin zweimal aus heißem Wasser umkristallisiert und im Vakuum bei 100⁰ getrocknet.

0,1548 g Substanz: 0,2520 g CO_2, 0,0545 g H_2O; C = 44,40 Proz.,
H = 3,91 „
0,030 g „ 13,8 ccm N (21°, 756 mm); N = 52,12 „
0,030 g „ 13,9 „ N (21°, 756 „): N = 52,47 „

	C	H	N
Gefunden 1	44,40	3,91	52,12
2	—	—	52,47
Berechnet: $C_5H_5N_5$	44,44	3,74	51,85

Zu weiterer Identifizierung wurde das Adenin in das Pikrat umgewandelt. Es bildete im Wasser schwer lösliche feine Nadeln und schmolz bei 283⁰ (unkorrigiert). Zur Analyse wurde es im Vakuum bei 100⁰ getrocknet:

0,0624 g Substanz: 17,5 ccm N (27°, 762 mm); N = 30,87 Proz.,
0,050 g „ 13,5 „ N (20°, 757 „); N = 30,81 „
0,050 g „ 13,5 „ N (20°, 757 „); N = 30,81 „
0,1513 g „ 0,2054 g CO_2, 0,0466 g H_2O; C = 37,02 „
H = 3,42 „
0,1544 g „ 0,2038 g CO_2, 0,0362 g H_2O; C = 36,00 „
H = 2,61 „

	C	H	N
Gefunden 1	37,02	3,42	30,87
2	36,00	2,61	30,81
3	—	—	30,81
Berechnet: $C_5H_5N_5 . C_6H_3N_3O_7$.	36,26	2,20	30,79

Phenylosazon des schwefelhaltigen Zuckers.

Wie schon erwähnt, wird die freie Base durch verdünnte Säure leicht in Adenin und einen schwefelhaltigen Zucker gespalten. Wenn man aber mit starker Säure lange Zeit erhitzt, so wird der gebildete Zucker wieder zerstört und es bildet sich dabei eine braune harzartige Substanz. Um die beste Ausbeute an Phenylosazon zu erzielen, verfuhren wir in folgender Weise:

1. 2 g der Base wurden mit 20 ccm 3proz. Salzsäure 1 Stunde auf 80° erwärmt. Die Flüssigkeit färbte sich dabei etwas gelblichbraun. Hierauf kühlte man ab, neutralisierte mit Natronlauge und versetzte mit einer Phenylhydrazinlösung (4 g salzsaures Phenylhydrazin und 6 g Natriumacetat in 15 ccm heißem Wasser gelöst und filtriert). Beim Erwärmen im Wasserbade auf 80° schied sich zuerst ein braunes Öl aus, welches sich später zum größten Teil in eine kristallinische Masse verwandelte. Nach 3 Stunden wurde abgekühlt. Die Kristallmasse wurde in 50proz. Alkohol warm gelöst, mit wenig Tierkohle behandelt und abfiltriert. Aus dem Filtrat schied sich das Phenylosazon in schönen gelben Prismen in reichlicher Menge aus. Aus der Mutterlauge erhielt man auf Zusatz von Wasser noch eine zweite Kristallisation.

Die Ausbeute des Osazons betrug 2,3 g aus 4 g freier Base.

2. Die Base wurde mit 3proz. Salzsäure 1 Stunde auf 80° erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die Flüssigkeit mit Phosphorwolframsäure versetzt, um das Adenin zu entfernen. Das Filtrat vom Phosphorwolframsäure-Niederschlag wurde nach dem Entfernen der überschüssigen Phosphorwolframsäure durch Baryt mit Natronlauge neutralisiert, zum Sirup eingedampft und mit warmem Alkohol extrahiert; nach dem Verdampfen des Alkohols wurde der schwefelhaltige Zucker als ein brauner Sirup erhalten. Er wurde in wenig Wasser gelöst und das Phenylosazon desselben auf die übliche Art dargestellt. Die Ausbeute betrug etwa 1 g aus 2 g freier Base.

Das zweimal aus heißem 50proz. Alkohol umkristallisierte reine Phenylosazon bildet schöne prismatische Kristalle. Im Kapillarrohre erhitzt, schmilzt es bei 158 bis 159° (unkorrigiert) und zersetzt sich bei höherer Temperatur. Wird eine kleine Menge dieses Osazons mit einem Stückchen metallischen Natriums geglüht und der Rückstand in 10 ccm Wasser gelöst und abfiltriert, so gibt das Filtrat tief rotviolette Färbung mit Nitroprussidnatrium oder eine schwarze Fällung mit Bleiessig.

Analyse des Phenylosazons.

Für die Analyse wurde das Phenylosazon im Vakuum bei 80° getrocknet:

0,0491 g	Substanz:	7,1 ccm N (22°, 764 mm);	N = 16,49 Proz.,
0,0500 g	„	7,0 „ N (21°, 765 „);	N = 16,00 „
0,0600 g	„	8,35 „ N (22°, 757 „);	N = 15,70 „
0,1214 g	„	0,2653 g CO_2, 0,070 g H_2O;	C = 59,58 „
			H = 6,41 „
0,1526 g	„	0,3363 g CO_2, 0,0885 g H_2O;	C = 60,10 „
			H = 6,44 „
0,1500 g	„	0,0999 g $BaSO_4$;	S = 9,15 „
0,1200 g	„	0,0797 g $BaSO_4$;	S = 9,12 „
0,1500 g	„	0,0997 g $BaSO_4$;	S = 9,13 „

	C	H	N	S
Gefunden 1	59,58	6,41	16,00	9,15
2	60,10	6,44	15,70	9,12
3	—	—	—	9,13
Berechnet: $C_{18}H_{22}N_4O_2S$	60,33	6,15	15,64	8,94

Die Analyse stimmt also mit der Formel $C_{18}H_{22}N_4SO_2$ überein, d. h. für das Phenylosazon des Thiozuckers $C_6H_{12}SO_4$.

$$\begin{array}{l} CHO \\ | \\ CHOH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2{-}S{-}CH_3 \end{array} + \begin{array}{c} H_2H, NHC_6H_5 \\ H_2NNHC_6H_5 \end{array} \rightarrow \begin{array}{l} CH.NNH.C_6H_5 \\ | \\ CNNHC_6H_5 \\ | \\ CHOH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2{-}S{-}CH_3 \end{array} = C_{18}H_{22}N_4O_2S$$

Thio-methyl-pentose-phenylosazon.

Oxydation der Base mit Salpetersäure.

Die freie Base löst sich in konzentrierter Salpetersäure unter Schäumen und entwickelt dabei braune Dämpfe von Stickstoffoxyd. Dampft man diese Lösung langsam auf dem Wasserbade ein, so scheiden sich farblose Kristalle aus, welche in Salpetersäure schwer löslich sind. Sie werden aus wenig heißem Wasser umkristallisiert, bei 100° getrocknet und analysiert:

0,056 g Substanz: 17,5 ccm N (22°, 765,4 mm); N = 34,97.

Für Hypoxanthinnitrat $C_5H_4N_4O$. HNO_3 berechnet sich N = 35,18. Die Analyse stimmt auf Hypoxanthinnitrat, welches durch Oxydation des Adenins gebildet worden ist.

Die Oxydation geht viel energischer vor sich, wenn man eine Spur von Vanadiumoxyd zur Salpetersäurelösung zugibt. In diesem Falle erhält man neben Hypoxanthin Xanthinnitrat, welches durch seine charakteristische Reaktion leicht zu identifizieren ist, indem die Kristalle mit einem Tropfen konzentrierter Salpetersäure vorsichtig verdampft werden; der dabei zurückbleibende gelbe Fleck wird durch Zusatz von Alkali tief rot. Die Mutterlauge des Hypoxanthins

bzw. Xanthinnitrats wurde mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Verdampfen des Äthers schieden sich lange farblose Kristalle von Oxalsäure aus, welche bei 98⁰ schmolzen und unlösliches Calciumoxalat ergaben. Die durch Ausäthern von Oxalsäure befreite Mutterlauge wurde mit Wasser verdünnt und mit Bariumchloridlösung versetzt; es entstand eine weiße Fällung von Bariumsulfat. Der Schwefel in der Base war also teilweise in Schwefelsäure übergeführt worden.

Zusammenfassung.

1. Aus der Roh-oryzaninfraktion, die aus alkoholischen Extrakten von Hefe nach dem Tanninverfahren dargestellt war, haben die Verfasser eine schwefelhaltige Base von der empirischen Formel $C_{11}H_{15}N_5SO_3$ (Schmelzpunkt 208⁰) isoliert. Die chemischen Eigenschaften derselben wurden genau beschrieben.

2. Diese Base wird durch verdünnte Säure leicht in Adenin und einen schwefelhaltigen Zucker von der Formel $C_6H_{12}O_4S$ gespalten. Der letztere wurde als Phenylosazon (Schmelzpunkt 158 bis 159⁰) identifiziert.

3. Mit Schwefelsäure gekocht, gibt die Base starke Furfurolreaktion. Sie gibt auch eine deutliche Pentosenreaktion mit *Bial*schem Reagenz. Mit Salpetersäure eingedampft, scheiden sich Hypoxanthin und Xanthin als salpetersaures Salz aus. Beim Ausäthern der Mutterlauge hiervon wurde Oxalsäure kristallinisch erhalten.

4. Es wurde festgestellt, daß der Schwefel in der Base durch Erhitzen mit verdünnter Säure oder Alkalien nicht als Schwefelsäure oder als Schwefelwasserstoff gespalten wird. Mit Salzsäure und Zink erhitzt, entwickelt sich dagegen ein stark riechendes Gas, welches wahrscheinlich als Mercaptan oder Dimethylsulfid anzusprechen ist.

5. Aus diesen Beobachtungen folgern die Verfasser, daß die Base höchstwahrscheinlich Adenyl-thio-methyl-pentose ist, und zwar von folgender Formel:

```
N=C—NH2
|   |          H   H   H   H
HC  C—N‹ ——— C—C—C—C—CH2—S'—CH3 = C11H15N5O3S
||  ||   >CH   |  |  |  |
N—C—N//        | OH OH  |
               |———O————|
\_____________/ \______________________/
    Adenin         Thio-methyl-pentose.
```

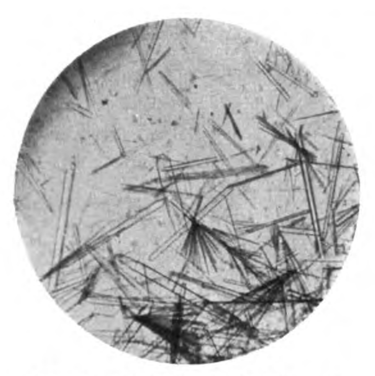


Abb. 1. Adenyl-Thiomethyl-Pentose, $C_{11}H_{15}N_5SO_3$. M. P. 208° (1 : 330).

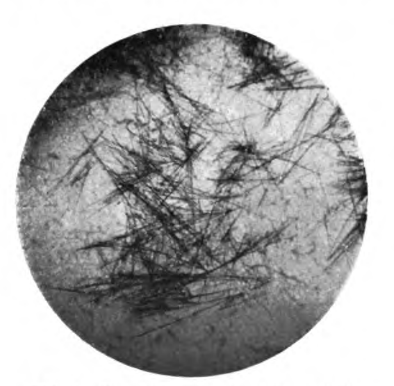


Abb. 2. Phenylosazon der Thiomethyl-Pentose. M. P. 159° (1 : 330).

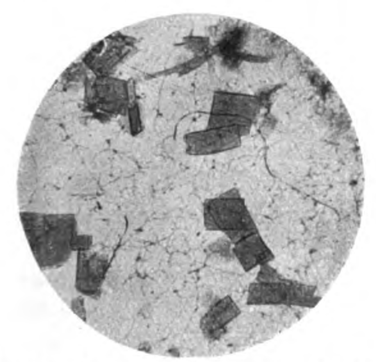


Abb. 3. Pikrat der Adenyl-Thiomethyl-Pentose, $C_{11}H_{15}N_5SO_3, C_6H_3N_3O_7$. M. P. 183° (1:780).

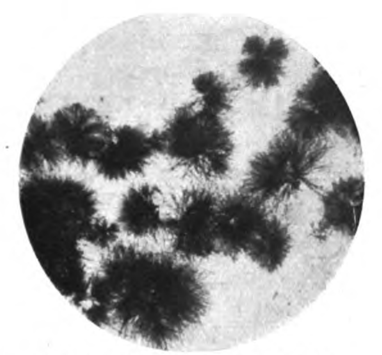


Abb. 4. Dasselbe Pikrat in Nadeln. M. P. 183° (1 : 330).

Untersuchung über Autolyse. IV.

Von

P. Rona, E. Mislowitzer und S. Seidenberg.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität, Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 24. November 1924.)

I. Verhalten der Fette bei der Autolyse.

1. Verhalten der Fette während der Autolyse von Leberbrei von normalen Meerschweinchen.

Über das Verhalten der Fette (bzw. höheren Fettsäuren) während der Autolyse liegen bis jetzt nur wenige Arbeiten vor. In jüngster Zeit hat sich am eingehendsten *U. Lombroso*[1]) mit der Frage beschäftigt. Im Rahmen unserer Untersuchungen über die Leberautolyse mußten wir auch diese Frage berühren, um zusammen mit dem Verhalten der Eiweißkörper und der Kohlehydrate eine bessere Einsicht in den Verlauf des Prozesses zu gewinnen.

Wir wandten zu unseren Fettbestimmungen das Verfahren von *Kumagawa* und *Suto* an. Im einzelnen wurde wie folgt verfahren:

Der getrocknete Leberbrei wird pulverisiert, wobei sorgsam darauf zu achten ist, daß nichts verloren geht, und dann in ein Becherglas mit 15 ccm fünffacher Normalnatronlauge (20 g NaOH in 100 ccm) getan. Das Becherglas mit Inhalt wird in ein kochendes Wasserbad versenkt und 2 Stunden darin belassen. Die Lösung wird dann noch heiß in einen Scheidetrichter gebracht. Das Becherglas wird mit heißem Wasser dreimal nachgespült. Die Flüssigkeit wird jetzt mit 20proz. Salzsäure (1,1 D) neutralisiert, und zwar so, daß man zunächst 10 ccm der Salzsäure zugibt, tüchtig schüttelt, abkühlt und dann den Rest von 10 ccm Salzsäure zugibt, wieder schüttelt und gut abkühlt. Nach guter Kühlung gibt man 40 ccm Äthyläther (fettfrei) in den Schütteltrichter zu und schüttelt tüchtig und lange. Nach kurzem Stehen erfolgt die Trennung. Die klare wässerige Schicht wird abgegossen, der bräunlich gefärbte Äther wird

---

[1]) Vgl. *U. Lombroso,* Ann. di clin. med. **11**, 78, 109, 1921; **12**, 65, 1922; Arch. intern. de Phys. **18**, 484, 1921; *U. Lombroso* und *V. Siracusa,* Ann. di clin. med. **12**, 1, 1922; vgl. auch *C. Ciaccio* und *G. Mantarro*, Arch. di science biol. **4**, 263, 1923.

in ein Becherglas gebracht. Der Trichter wird zweimal mit Äther gut nachgespült und der klare Äther dann zu dem vorherigen zugegeben. Der im Schütteltrichter zurückgebliebene Niederschlag wird mit etwas Normalnatronlauge unter Schütteln wieder aufgelöst, dann wieder mit Äther ausgeschüttelt und der Äther zu dem vorherigen zugegeben. Der so vereinigte Äther wird verdunstet, dann nochmals mit Äther aufgenommen, durch Asbest abfiltriert und wieder verdunstet, wozu wir eine elektrische Heizplatte benutzen.

Der Ätherrückstand wird bei 50° 3 bis 4 Stunden getrocknet, und dann mit Petroläther extrahiert. Zu dem Zwecke gießt man auf den noch warmen Ätherrückstand etwa 20 ccm Petroläther. Dabei tritt in der Regel eine milchige Trübung auf. Das Becherglas wird jetzt mit einem Uhrglas bedeckt und ½ bis 1 Stunde stehengelassen. Hierauf wird der Petroläther in ein vorher gewogenes Schälchen durch Asbest hineinfiltriert, das farblose Filtrat verdunstet und einige Stunden bei 50° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und die Fettsäuren gewogen.

Zur Prüfung dieser Methode vermengten wir eine uns bekannte Menge Schweinefett mit fettfreiem Casein und extrahierten das Fett nach obiger Methode. Von diesen Vorversuchen seien nur einige angeführt, aus welchen deutlich zu ersehen ist, daß die Abweichungen von den zu erwartenden Werten nur 2 bis 4 Proz. betragen, und daß die Methode sich auch für die Bestimmung ganz kleiner Mengen eignet.

1. *Vorversuch*: 1,237 g Casein wird mit 0,176 g Schweinefett gut verrieben. Das Gemisch wie oben angegeben verarbeitet. Zurückgewonnen . . . . 0,171 g

2. *Vorversuch*: 1,463 g Casein wird mit 0,0473 g Schweinefett gut verrieben. Das Gemisch wie oben angegeben verarbeitet. Zurückgewonnen . . . . 0,0459 g

3. *Vorversuch*: 1,389 g Casein wird mit 0,0981 g Schweinefett gut verrieben. Das Gemisch wie oben angegeben verarbeitet. Zurückgewonnen . . . . 0,0954 g

Die Versuche sollten vor allem das Ausmaß der Änderung des Gehalts an hochmolekularen Fettsäuren während der Autolyse und ihre Abhängigkeit von der H-Ionenkonzentration feststellen. Verarbeitet wurde stets der Leberbrei von zwei normalen Meerschweinchen, genau unter den in den vorherigen Mitteilungen über denselben Gegenstand beobachteten Vorsichtsmaßregeln.

Versuch 1: 34,5 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (n/10 Weinsäurepuffer). p_H = 3,86. Gesamtfett der Leber 0,7152 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge		
	g		Proz.
Sofort	0,0476 0,0418	0,0447	100
Nach 24 Std.	0,0412 0,0462	0,0437	97,7
„ 48 „	0,0316 0,0388	0,0352	78,7

Versuch 2: 25,5 g Leberbrei + 320 ccm Puffergemisch (n/10 Weinsäurepuffer 1,0 : 1,5). p_H = 3,88. Gesamtfett der Leber 0,672 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge		
	g		Proz.
Sofort	0,0414 0,0426	0,0420	100
Nach 144 Std.	0,0432 0,0478	0,0455	108,3
„ 192 „	0,0411 0,0400	0,0405	96,43

Versuch 3: 41,8 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (n/10 Weinsäurepuffer 1,0 : 1,5). p_H = 3,81. Gesamtfett der Leber 1,1776 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge		
	g		Proz.
Sofort	0,0720 0,0752	0,0736	100
Nach 24 Std.	0,0758 0,0726	0,0742	100,8
„ 72 „	0,0570 0,0584	0,0577	78,4

Versuch 4: 37 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (n/10 Weinsäurepuffer). p_H = 3,91. Gesamtfett der Leber 5,6656 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge		
	g		Proz.
Sofort	0,4052 0,4030	0,4041	100
Nach 24 Std.	0,4412 0,4258	0,4335	107,3
„ 192 „	0,3906 0,4062	0,3984	98,6

Versuch 5: 31 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (n/10 Weinsäurepuffer). p_H = 4,1. Gesamtfett in der Leber 1,0192 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge		
	g		Proz.
Sofort	0,0614 0,0660	0,0637	100
Nach 24 Std.	0,0500 0,0488	0,0494	77,5
„ 48 „	0,0432 0,0427	0,0430	67,5

Versuch 6: 30,6 g Leberbrei + 300 ccm Pufferlösung (n/10 Weinsäurepuffer). p_H = 4,15. Gesamtfett in der Leber 1,24 g.

Ausbeute: 2 × 20 ccm Lebersuspension	Fettsäuremenge g		Proz.
Sofort	0,0766 0,0784	0,0775	100
Nach 24 Std.	0,0597 0,0744	0,0670	86,45
„ 48 „	0,0610 0,0628	0,0619	79,87

Versuch 7: 30,0 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (n/10 Weinsäurepuffer 1,0 : 9,0). p_H = 5,3. Gesamtfett in der Leber 0,6928 g.

Ausbeute: 2 × 20 ccm Lebersuspension	Fettsäuremenge g		Proz.
Sofort	0,0443 0,0420	0,0433	100
Nach 24 Std.	0,0323 0,0352	0,0338	78,1
„ 96 „	0,0394 0,0370	0,0382	88,2
„ 144 „	0,0406 0,0394	0,0400	92,4

Versuch 8: 39,5 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (n/10 Weinsäurepuffer 1,0 : 9,0). p_H = 5,5. Gesamtfett in der Leber 1,008 g.

Ausbeute: 2 × 20 ccm Lebersuspension	Fettsäuremenge g		Proz.
Sofort	0,0620 0,0641	0,0630	100
Nach 48 Std.	0,0618 0,0634	0,0626	99,4
„ 96 „	0,0616 0,0610	0,0613	97,3
„ 192 „	0,0637 0,0598	0,0617	97,9

Versuch 9: 50 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (n/10 Weinsäurepuffer 1,0 : 9,0). p_H = 5,5. Gesamtfett in der Leber 2,1648 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge g		Proz.
Sofort	0,1304 0,1403	0,1353	100
Nach 24 Std.	0,1312 0,1332	0,1322	97,7
„ 72 „	0,1150 0,1210	0,1180	87,2
„ 144 „	0,1197 0,1196	0,1196	87,6

*

Versuch 10:

15,25 g Leberbrei (gelbe Fettleber) + 320 ccm Pufferlösung (m/15 Phosphatpuffer 4,0 : 1,0. p_H = 6,01).
Gesamtfett in der Leber 1,9936 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge		
	g		Proz.
Sofort	0,1280 0,1212	0,1246	100
Nach 24 Std.	0,1172 0,1176	0,1174	94,2
„ 144 „	0,0880 0,0960	0,0920	73,8
„ 196 „	0,1138 0,1034	0,1086	87,2

Versuch 11:

33,5 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (m/15 Phosphatpuffer 4,0 : 1,0). p_H = 6,01. Gesamtfett in der Leber 1,0864 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge		
	g		Proz.
Sofort	0,0674 0,0684	0,0679	100
Nach 24 Std.	0,0699 0,0662	0,0680	100,1
„ 144 „	0,0669	0,0669	98,5
„ 192 „	0,0667 0,0687	0,0677	99,7

Versuch 12:

31,8 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (m/15 Phosphatpuffer 4,0 : 1,0). p_H = 6,1. Gesamtfett in der Leber 0,7472 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge		
	g		Proz.
Sofort	0,0478 0,0456	0,0467	100
Nach 24 Std.	0,0400 0,0446	0,0423	90,6
„ 48 „	0,0410 0,0410	0,0410	87,8
„ 96 „	0,0370 0,0402	0,0386	82,7

Versuch 13: 20,6 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (m/15 Phosphatpuffer 4,0 : 1,0). $p_H = 6,18$. Gesamtfett in der Leber 0,688 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge g		Proz.
Sofort	0,0429 0,0430	0,0430	100
Nach 24 Std.	0,0302 0,0290	0,0296	68,8
„ 144 „	0,0306 0,0304	0,0305	70,93
„ 196 „	0,0312 0,0306	0,0309	71,86

Versuch 14: 22,0 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (m/15 Phosphatpuffer 4,0 : 1,0). $p_H = 6,19$. Gesamtfett in der Leber 0,4048 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge g		Proz.
Sofort	0,0238 0,0268	0,0253	100
Nach 48 Std.	0,0272 0,0270	0,0271	105,5
„ 96 „	0,0232 0,0262	0,0247	97,6

Versuch 15: 32,0 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (m/15 Phosphatpuffer 6,2 : 3,8). $p_H = 6,93$. Gesamtfett in der Leber 1,5504 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge g		Proz.
Sofort	0,0978 0,0960	0,0969	100
Nach 48 Std.	0,0854 0,0733	0,0794	81,9
„ 96 „	0,0884 0,0762	0,0823	84,9
„ 192 „		0,0828	85,5

Versuch 16: 37,0 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (m/15 Phosphatpuffer 6,2 : 3,8). $p_H = 6,91$. Gesamtfett der Leber 1,1072 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge g		Proz.
Sofort	0,0677 0,0706	0,0692	100
Nach 48 Std.	0,0686 0,0678	0,0682	98,6
„ 96 „	0,0660 0,0609	0,0634	91,6
„ 168 „	0,0694 0,0592	0,0643	92,9

Versuch 17: 29,0 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (m/15 Phosphatpuffer 6,2 : 3,8). p_H = 6,92. Gesamtfett in der Leber 0,64 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge		
	g		Proz.
Sofort	0,0399 0,0400	0,0400	100
Nach 48 Std.	0,0392 0,0382	0,0387	96,8
„ 96 „	0,0445 0,0353	0,0399	99,8
„ 168 „	0,0364 0,0364	0,0364	91,0

Versuch 18: 29,0 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (m/10 sekundäre Natriumphosphatlösung). p_H = 7,8. Gesamtfett in der Leber 0,851 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge		
	g		Proz.
Sofort	0,0526 0,0538	0,0532	100
Nach 96 Std.	0,0434 0,0418	0,0425	79,9
„ 144 „	0,0478 0,0458	0,0468	87,9

Versuch 19: 26,5 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (m/10 sekundäre Natriumphosphatlösung). p_H = 7,54. Gesamtfett in der Leber 0,699 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge		
	g		Proz.
Sofort	0,0437 0,0438	0,0437	100
Nach 24 Std.	0,0420 0,0389	0,0404	92,4
„ 96 „	0,0430 0,0436	0,0433	99,0
„ 114 „	0,0376 0,0420	0,0398	91,1

Aus der Gesamtheit der Versuche ergibt sich, daß die Abnahme der hochmolekularen Fettsäuren während der Autolyse selbst nach längerer Dauer derselben (bis 8 Tage) nur äußerst geringfügig ist, wie dies auch *Lombroso* gefunden hat. Sie beträgt etwa 10 bis 20 Proz. der ursprünglichen Menge; in einer Reihe von Versuchen übersteigt sie kaum die Fehlerbreite der Methode. Irgendein Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration konnte nicht gefunden werden. Anzeichen einer Fettbildung (etwa aus Eiweißkörpern oder Kohlehydraten) wurden nicht beobachtet.

2. Verhalten der Fette während der Autolyse von Leberbrei von mit Phosphor vergifteten Meerschweinchen.

Die Ausführung der Versuche erfolgte genau in der in der III. Mitteilung dargelegten Weise. Im einzelnen verliefen die Versuche wie folgt:

Versuch 1: Zwei Meerschweinchen mit je 0,5 ccm einer 1proz. Phosphorlösung injiziert. Tötung nach 2 Tagen. 61,0 g Leberbrei + 320 ccm m/10 sekundärer Natriumphosphatlösung. $p_H = 7,82$. Gesamtfett 1,515 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge		
	g		Proz.
Sofort	0,0954 0,0940	0,0947	100
Nach 24 Std.	0,0997 0,0912	0,0955	100,8
„ 96 „	0,0996 0,1019	0,1007	106,3
„ 192 „	0,0940 0,0930	0,0935	98,7

Versuch 2: Anordnung wie oben. 45,0 g Leberbrei + 320 ccm m/10 sekundärer Natriumphosphatlösung. $p_H = 7,82$. Gesamtfett 0,838 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge		
	g		Proz.
Sofort	0,0512 0,0536	0,0524	100
Nach 24 Std.	0,0525 0,0514	0,0520	99,3
„ 96 „	0,0472 0,0507	0,0490	93,5
„ 192 „	0,0510 0,0490	0,0500	95,4

Versuch 3: Anordnung wie oben. 41,0 g Leberbrei + 320 ccm m/15 Phosphatlösung 6,2 : 3,8). $p_H = 6,90$. Gesamtfett 1,70 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge		
	g		Proz.
Sofort	0,1042 0,1086	0,1064	100
Nach 48 Std.	0,1037 0,1056	0,1047	98,4
„ 120 „	0,0940 0,1012	0,0976	91,7
„ 192 „	0,0996 0,1005	0,1000	93,9

Versuch 4: Anordnung wie oben. 43,0 g Leberbrei + 320 ccm m/15 Phosphatpufferlösung 6,2 : 3,8. p_H = 6,89. Gesamtfett 2,448 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge		
	g		Proz.
Sofort	0,1542 0,1517	0,1530	100
Nach 48 Std.	0,1330 0,1262	0,1296	84,6
„ 120 „	0,1318 0,1558	0,1438	93,9
„ 192 „	0,1440 0,1494	0,1467	95,8

Versuch 5: Anordnung wie oben. 43,0 g Leberbrei + 320 ccm m/15 Phosphatpufferlösung 0,8 : 9,2. p_H = 6,02. Gesamtfett 6,04.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge		
	g		Proz.
Sofort	0,1593 0,1586	0,1590	100
Nach 48 Std.	0,1586 0,1587	0,1587	99,8
„ 96 „	0,1652 0,1638	0,1645	103,4
„ 192 „	0,1575 0,1672	0,1601	100,6

Versuch 6: Anordnung wie oben. 48,0 g Leberbrei + 320 ccm m/15 Phosphatpufferlösung 0,8 : 9,2. p_H = 6,04. Gesamtfett 2,813 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge		
	g		Proz.
Sofort	0,1789 0,1728	0,1758	100
Nach 24 Std.	0,1782 0,1847	0,1815	103,2
„ 96 „	0,1685 0,1720	0,1703	96,3
„ 192 „	0,1799 0,1706	0,1752	99,6

Versuch 7: Anordnung wie oben. 52,8 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (n/10 Weinsäurepuffer 1,0 : 9,0). p_H = 5,13. Gesamtfett 4,944 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge		
	g		Proz.
Sofort	0,3007 0,3174	0,3090	100
Nach 48 Std.	0,3019 0,2622	0,2820	91,2
„ 120 „	0,3131 0,2706	0,2918	94,4
„ 192 „	0,2972 0,2970	0,2971	96,1

Versuch 8: Anordnung wie oben. 45,4 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (n/10 Weinsäurepuffer 1,0 : 9,0). $p_H = 5,13$.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension		Fettsäuremenge g	Proz.
Sofort	0,3222 0,2936	0,3097	100
Nach 48 Std.	0,3059 0,2912	0,2985	96,9
„ 192 „	0,3006 0,3190	0,3098	100,5

Versuch 9: Anordnung wie oben. 28,0 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (n/10 Weinsäurepuffer 1,0 : 1,5). $p_H = 4,24$. Gesamtfett 0,7968 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension		Fettsäuremenge g	Proz.
Sofort	0,0536 0,0460	0,0498	100
Nach 24 Std.	0,0444 0,0460	0,0452	90,8
„ 72 „	0,0425 0,0446	0,0435	87,4
„ 192 „	0,0400 0,0399	0,0400	80,3

Versuch 10: Anordnung wie oben. 28,5 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (n/10 Weinsäurepuffer 1,0 : 1,5). $p_H = 4,24$. Gesamtfett 0,8416 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension		Fettsäuremenge g	Proz.
Sofort	0,0526 0,0526	0,0526	100
Nach 24 Std.	0,0574 0,0597	0,0585	111,2
„ 72 „	0,0570 0,0542	0,0556	105,7
„ 192 „	0,0534 0,0528	0,0531	100,9

Versuch 11: Anordnung wie oben. 35,0 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (n/10 Weinsäurepuffer 1,0 : 1,0). $p_H = 3,5$. Gesamtfett 1,491 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension		Fettsäuremenge g	Proz.
Sofort	0,0936 0,0929	0,0932	100
Nach 96 Std.	0,0968 0,0902	0,0935	100,3
„ 144 „	0,0832 0,0800	0,0816	84,3

Versuch 12: Anordnung wie oben. 37,5 g Leberbrei + 320 ccm Pufferlösung (n/10 Weinsäurepuffer 1,0 : 1,0). $p_H = 3,5$. Gesamtfett 1,0736 g.

Abnahme: 2 × 20 ccm der Lebersuspension	Fettsäuremenge g		Proz.
Sofort	0,0676 0,0666	0,0671	100
Nach 24 Std.	0,0710 0,0740	0,0725	108,0
„ 96 „	0,0672 0,0702	0,0687	102,3
„ 114 „	0,0562 0,0603	0,0582	86,7

Aus dieser Versuchsreihe ist es noch deutlicher ersichtlich, daß die gesamte Fettsäuremenge im Autolysat keine Änderung erfährt. Eine etwaige Abnahme übersteigt kaum die Fehlergrenzen der Methode, selbst den an und für sich geringen Fettschwund bei normalen Lebern findet man hier nicht. Meist ist die Konstanz überraschend. Über die Fettspaltung sagen diese Versuche direkt natürlich nichts aus. Die experimentelle Prüfung dieser Frage ist wegen der schwierigen quantitativen Extraktion der Neutralfette[1]) nicht leicht, sie soll jedoch versucht werden. Für die Fettbildung während der Autolyse finden sich auch hier keine Anhaltspunkte.

II. Über Beeinflussung der Autolyse der Leber von Meerschweinchen durch Fremdstoffe.

In der zweiten Mitteilung über die Autolyse[2]) wurden Untersuchungen über die Beeinflussung der autolytischen Eiweißspaltung durch Salze, zumeist Neutralsalze, mitgeteilt. Im Anschluß daran möge hier eine Reihe von Versuchen über die Wirkung einiger pharmakologisch wichtiger Verbindungen wiedergegeben werden. Zum Teil sind sie bereits früher auf ihr Verhalten gegenüber dem autolytischen Prozesse geprüft worden[3]), doch hat dabei der inzwischen als überaus wesentlich erkannte Faktor der Acidität des Mediums keine genügende Berücksichtigung erfahren, so daß eine Nachuntersuchung uns geboten erschien. An der bisher geübten Methode wurde nichts geändert; bezüglich der Einzelheiten sei auf die erste und zweite Mitteilung verwiesen.

Geprüft wurde Natrium salicylicum, Chininum hydrochloricum, Atoxyl, arsenige Säure, Arsensäure, zuletzt FNa, alle in analysenreinem Zustande. Die angewandten Konzentrationen (in Prozenten

[1]) Vgl. hierzu z. B. *M. Kumagawa* in Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden 5, 477, 1912.

[2]) Diese Zeitschr. **146**, 1, 1924.

[3]) Vgl. hierzu vor allem die Arbeiten von *E. Laqueur* (mit *J. Ettinger* und *K. Brünecke*), Zeitschr. f. physiol. Chem. **79**, 1—82, 1912.

oder Molen) finden sich in jedem Versuch angegeben, ebenso die Pufferlösung, wie auch die potentiometrisch ermittelten p_H-Werte.

1. Versuche mit Natrium salicylicum.

Hier ist selbst bei geringeren Konzentrationen an dieser Verbindung die Untersuchung nur in einem ganz beschränkten Bereich der H-Ionenkonzentration möglich (bis etwa p_H 6), da die in saurem Gebiet frei gewordene Salicylsäure in wässerigen Lösungen äußerst wenig löslich ist.

Versuch 1: 10 g Leberbrei in 150 ccm destillierten Wassers suspendiert. Von der Suspension je 20 ccm in ein Kölbchen getan, dazu je 10 ccm Pufferlösung und 10 ccm Na salicyl. bzw. destilliertes Wasser. Pufferlösung: Essigsäure/Natriumacetat (Endkonzentration m/16). p_H = 5,79.

In 5 ccm der Suspension 4,59 mg Gesamt-N, $0,30_5$ mg Rest-N. Na-salicyl.-Konzentration der zugesetzten Lösung: im Kölbchen 1: 0,66 Proz. (0,0412 mol.); 2: 0,33 Proz. (0,0206 mol.); 3: 0,066 Proz. (0,00412 mol.); 4: 0,022 Proz. ($0,0013_7$ mol.); 5: destilliertes Wasser.

Kolben	1	2	3	4	5
Rest-N, mg nach 4 Std.	0,57	0,58	0,59	0,58	0,57
„ „ „ 24 „	1,53	1,33	1,39	1,46	$1,29_6$
Rest-N in Proz. des Ges.-N nach 4 Std.	12,4	12,6	12,8	12,2	12,7
„ „ „ „ „ „ 24 „	33,3	29,0	30,3	31,7	28,2
p_H (elektr.)	6,04	6,03	6,10	6,04	5,99

Versuch 2: 18 g Leberbrei in 140 ccm destillierten Wassers suspendiert. Anordnung der Kölbchen, Na-salicyl.-Konzentration und Pufferung wie im ersten Versuch.

In 5 ccm der Suspension 9,03 mg Gesamt-N, 0,46 mg Rest.-N.

Kolben	1	2	3	4	5
Rest-N, mg nach 4 Std.	0,93	0,90	0,90	0,95	0,89
„ „ „ 24 „	2,59	2,48	2,29	2,22	2,06
Rest-N in Proz. des Ges.-N nach 4 Std.	10,3	10,1	10,0	10,0	9,9
„ „ „ „ „ „ 24 „	28,7	27,5	25,4	24,6	22,8
p_H (elektr.)	6,01	5,98	5,92	6,03	5,96

In beiden Versuchen zeigen sich nach 24 Stunden gegenüber den Wasserwerten wesentlich erhöhte Stickstoffzahlen, die mit zunehmender Na-salicyl.-Konzentration ansteigen.

Versuch 3: 9,5 g Leberbrei in 150 ccm destillierten Wassers suspendiert. Anordnung der Kölbchen, Na-salicyl.-Konzentration und Pufferlösung wie in vorhergehenden Versuchen.

In 5 ccm Suspension 4,39 mg Gesamt-N und $0,25_4$ mg Rest-N.

Kolben	1	2	3	4	5
Rest-N, mg nach 4 Std.	0,58	0,58	0,54	0,54	0,52
„ „ „ 24 „	1,12	1,11	1,25	1,12	0,84
Rest-N in Proz. des Ges.-N nach 4 Std.	13,3	13,2	12,4	12,2	11,9
„ „ „ „ „ „ 24 „	26,3	25,4	28,6	25,5	19,2
p_H (elektr.)	6,22	6,15	6,13	6,11	6,22

Bei diesem Versuch ist die Förderung der Autolyse durch Na salicyl. bei den 24-Stundenwerten wohl noch deutlicher; bei den höheren Konzentrationen ist sie bereits nach 4 Stunden nachweisbar. Da die H-Ionenkonzentration in allen Proben der drei Versuche stets gleich geblieben ist, so kann man von einer sicheren Förderung der autolytischen Eiweißspaltung durch Na salicyl. sprechen. Die zur Erzielung dieser Wirkung nötige Salzkonzentration ist erheblich geringer, als sie z. B. beim NaCl sein müßte; sie ist demnach dem Salicyl-Ion zuzuschreiben.

2. *Versuche mit Chininum hydrochloricum.*

Versuch 1: 18,0 g Leberbrei mit 140 ccm Pufferlösung zur Suspension. Von dieser Suspension je 20 ccm in die entsprechenden Kölbchen, dazu 20 ccm Chininlösung bzw. destillierten Wassers. Die Pufferlösung besteht aus Milchsäure und milchsaurem Natrium im Verhältnis 1,25 : 1,00, und ist in den Kölbchen in n/10 Konzentration.

Die Konzentration an Chininum hydrochlor. in den Kölbchen ist: Im Kölbchen 1: 0,2 Proz. (0,0055 mol.); 2: 0,05 Proz. (0,0014 mol.); 3: 0,02 Proz. (0,000 55 mol.); 4: 0,005 Proz. (0,000 14 mol.). In 5: destilliertes Wasser. Die abzurechnende N-Menge für die zur Analyse verwandte Portion beträgt im Kölbchen 1: 0,16 mg; 2: 0,042 mg; 3: 0,016 mg; 4: 0,0042 mg.

In 5 ccm der Suspension 6,15 mg Gesamt-N, $0{,}63_5$ mg Rest-N.

Kolben	1	2	3	4	5
Rest-N, mg nach 4 Std.	1,88	2,62	$2{,}99_5$	3,10	2,73
„ „ „ 24 „	3,16	4,59	5,02	5,12	4,76
Rest-N in Proz. des Ges.-N nach 4 Std.	30,6	42,7	48,6	50,2	44,5
„ „ „ „ „ „ 24 „	51,1	74,8	81,8	83,2	77,4
p_H (elektr.)	—	—	—	—	3,81

Versuch 2: 10,0 g Leberbrei mit 150 ccm Pufferlösung wie im ersten Chininversuch versetzt. Die Chininkonzentrationen sind im Kölbchen 1: 0,05 Proz. (0,0014 mol.); 2: 0,02 Proz. (0,000 55 mol.); 3: 0,005 Proz. (0,000 14 mol.); 4: destilliertes Wasser.

In 5 ccm der Suspension 4,57 mg Gesamt-N und 0,37 mg Rest-N.

Kolben	1	2	3	4
Rest-N, mg nach 4 Std.	0,83	1,51	1,72	1,33
„ „ „ 24 „	2,73	2,90	3,36	2,63
Rest-N in Proz. des Ges.-N nach 4 Std.	18,3	32,4	37,6	$29{,}1_5$
„ „ „ „ „ „ 24 „	59,9	63,5	73,6	57,5
p_H (elektr.)	4,05	4,03	3,94	3,98

Versuch 3: 11,0 g Leberbrei mit 150 ccm Pufferlösung zur Suspension. Pufferlösung 20 wie im Versuch 1 und 2. Chininkonzentration wie im Versuch 1. Die Chininbase wird mit Kaliumquecksilberjodid aus der zu verarbeitenden Lösung entfernt.

In 5 ccm der Suspension 5,85 mg Gesamt-N und $0{,}49_5$ mg Rest-N.

Kolben	1	2	3	4	5
Rest-N, mg nach 4 Std.	1,64	1,92	$2{,}09_6$	2,48	1,97
„ „ „ 24 „	$2{,}72_6$	3,20	3,35	4,19	3,85
Rest-N in Proz. des Rest-N nach 4 Std.	28,0	32,8	35,8	42,4	33,7
„ „ „ „ „ „ 24 „	46,6	54,8	57,7	71,6	65,8
p_H (elektr.)	3,67	—	3,74	—	3,76

Versuch 4: 25,0 g Leberbrei mit 140 ccm Pufferlösung zur Suspension. Chininmengen und Pufferlösung wie in den vorhergehenden Versuchen. In 5 ccm der Suspension 7,08 mg Gesamt-N und 0,709 mg Rest-N.

Kolben	1	2	3	4	5
Rest-N, mg nach 24 Std.	2,43	2,73	4,21	4,29	3,99
„ in Proz. des Ges.-N nach 24 Std.	34,3	38,5	59,4	60,5	56,3
p_H (elektr.)	3,76	—	3,88	3,93	—

Die vier Chininversuche wurden, wie aus den Tabellen hervorgeht, sämtlich bei optimaler H-Ionenkonzentration angestellt. Ihre Ergebnisse stimmen gut überein. Kleine Chininmengen zeigen unzweifelhaft eine Beschleunigung oder Vermehrung der Proteolyse, größere eine deutliche Hemmung. Als fördernd erweist sich bereits eine m/7000 Chininkonzentration, während eine zehnfach höhere Konzentration Chinin zumeist schon hemmt.

3. *Versuche mit Atoxyl.*

Mit Atoxyl wurden zwei Versuche bei optimaler Reaktion, zwei weitere abseits davon angestellt.

Versuch 1: 12,8 g Leberbrei mit 120 ccm destillierten Wassers zur Suspension. Hiervon je 20 ccm in Kolben 1 bis 6; außerdem in jedes Kölbchen 10 ccm Puffergemisch (Milchsäure 1,25 zu milchsaurem Natrium 1,00 (m/5) und ferner 10 ccm Atoxyllösung in folgenden Konzentrationen: Kolben 1: 2 Proz. (0,083 mol.); 2: 0,5 Proz. (0,0208 mol.); 3: 0,2 Proz. ($8{,}3 \cdot 10^{-3}$ mol.); 4: 0,02 Proz. ($8{,}3 \cdot 10^{-4}$ mol.); 5: 0,002 Proz. ($8{,}3 \cdot 10^{-5}$ mol.); 6: destilliertes Wasser.
In 5 ccm der Suspension 8,33 mg Gesamt-N und $0{,}44_8$ mg Rest-N.

Kolben	1	2	3	4	5	6
Rest-N, mg nach 4 Std.	—	1,48	1,71	1,83	2,04	2,10
„ „ „ 24 „	2,83	3,70	3,80	4,29	4,62	4,54
Rest-N in Proz. d. Ges.-N in 4 Std.	—	17,9	20,6	22,1	24,6	25,3
„ „ „ „ „ „ 24 „	34,1	44,7	45,8	52,8	55,6	54,7
p_H (elektr.)	3,98	3,98	3,98	3,96	3,96	3,94

Wie aus diesem Versuch hervorgeht, verringert eine Atoxylkonzentration von etwa $^1/_{1200}$ Molarität schon sichtlich den Verlauf der Proteolyse; die Konzentrationen darüber hemmen immer stärker; eine Konzentration von m/12 verringert den Umsatz auf ungefähr die Hälfte.

Versuch 2: 19,3 g Leberbrei mit 120 ccm destillierten Wassers zur Suspension. Hiervon je 20 ccm in Kolben 1 bis 6; außerdem in jedes Kölbchen 10 ccm Pufferlösung [Milchsäure : milchsaurem Natrium 1,0 : 6,0; (m/5)] und ferner 10 ccm Atoxyllösung wie im Atoxylversuch 1.

In 5 ccm der Suspension 9,77 mg Gesamt-N und 0,57₉ mg Rest-N.

Kolben	1	2	3	4	5	6
Rest-N, mg nach 4 Std.	1,76	1,71	1,59	1,67	1,79	1,77
„ „ „ 24 „	3,08	2,89	3,07	3,79	3,98	3,79
Rest-N in Proz. d. Ges.-N n. 4 Std.	18,0	17,6	16,3	17,1	18,4	18,1
„ „ „ „ „ „ 24 „	31,1	29,6	31,5	38,7	40,8	38,7
p_H (elektr.)	4,79	4,75	4,70	4,70	4,62	4,62

Aus dem Versuch 2 ist zu ersehen, daß abseits vom Optimum die Wirkung des Atoxyls im gleichen Sinne wie im Optimum verläuft, aber viel schwächer ist. Der Umsatz unter dieser Bedingung war selbst bei m/12 Konzentration des Atoxyl nur um etwa 20 Proz. geringer als ohne Atoxyl.

Versuch 3: 9 g Leberbrei mit 80 ccm destillierten Wassers zur Suspension. Je 20 ccm in die Kölbchen, dazu je 10 ccm Pufferlösung (wie im ersten Atoxylversuch) und 10 ccm Atoxyllösung, und zwar in Kölbchen 1: 0,0004 Proz. (16,6 . 10^{-6} mol.); 2: 0,00013 Proz. (5,5 . 10^{-6} mol.); 3: 0,000067 Proz. (2,76 . 10^{-6} mol.); 4: destilliertes Wasser.

In 5 ccm Suspension 7,48 mg Gesamt-N und 0,83 mg Rest-N.

Kolben	1	2	3	4
Rest-N, mg nach 4 Std.	2,01	1,96	1,95	2,05
„ „ „ 24 „	4,42	—	4,34	4,23
Rest-N in Proz. des Ges.-N nach 4 Std. .	27,1	26,3	26,2	27,6
„ „ „ „ „ „ 24 „ .	59,1	—	58,1	56,6
p_H (elektr.)	3,81	3,77	3,67	3,77

Versuch 4: Leberbrei vom Atoxylversuch 3. Anfangsreststickstoff und Gesamtstickstoff wie im Versuch 3. Atoxylkonzentration wie im Versuch 3. Pufferlösung wie im Versuch 2.

Kolben	1	2	3	4
Rest-N, mg nach 4 Std.	1,17	1,17	1,02	0,96
„ „ „ 24 „	2,38	2,27	2,22	0,91
Rest-N in Proz. des Ges.-N nach 4 Std. .	15,7	15,7	13,7	12,9
„ „ „ „ „ „ 24 „ .	31,8	30,3	29,7	25,6
p_H (elektr.)	4,67	4,63	4,67	4,69

Die beiden letzten Versuche mit minimalen Atoxylkonzentrationen zeigen keine sicher nachweisbare Wirkung mehr; im Versuch 4 ist jedoch eine fördernde Wirkung angedeutet.

4. Versuche mit Arsen[1]).

Das Arsen kam als Arsentrioxyd und Arsenpentoxyd zur Anwendung. Der erste Versuch wurde mit As_2O_3 angestellt, und zwar eine Portion bei optimaler, eine andere bei nicht optimaler Reaktion.

Versuch 1: 11,6 g Leberbrei mit 160 ccm destillierten Wassers zur Suspension. Die Hälfte der Suspension wird für die Portion A, die andere Hälfte für die Portion B verwandt. In der Portion A sind in jedem Kölbchen 20 ccm der Suspension, 10 ccm Pufferlösung [Milchsäure : milchsaurem Natrium 1 : 1 (m/5)] und 10 ccm einer Lösung von As_2O_3 von der Konzentration: Kolben 1: 0,16 Proz. (8,1 . 10^{-3} mol.); 2: 0,016 Proz. (8,1 . 10^{-3} mol.); 3: 0,0016 Proz. (8,1 . 10^{-5} mol.). In der Portion B ist alles wie in A, nur die Pufferung ist Milchsäure : milchsaurem Natrium 1 : 1 (m/5).

In 5 ccm der Suspension Gesamt-N 4,38 mg, Rest-N $0{,}30_6$ mg.

A.

Kolben	1	2	3	4
Rest-N, mg nach 4 Std.	1,16	1,16	1,13	1,15
„ „ „ 24 „	2,36	2,32	2,29	2,27
Rest-N in Proz. d. Ges.-N nach 4 Std.	26,7	26,5	25,9	26,4
„ „ „ „ „ „ 24 „	52,9	53,0	52,3	52,0
p_H (elektr.)	—	3,98	—	4,01

B.

Kolben	1	2	3	4
Rest-N, mg nach 4 Std.	1,18	0,69	0,68	0,65
„ „ „ 24 „	1,67	1,41	1,30	1,28
Rest-N in Proz. d. Ges.-N nach 4 Std.	26,9	15,8	15,2	15,0
„ „ „ „ „ „ 24 „	38,3	32,3	29,7	23,2
p_H (elektr.)	—	4,87	—	4,93

Im Optimum zeigt sich zwischen m/12000 und m/120 Konzentration keine Wirkung im Vergleich mit dem Versuch ohne As_2O_3. Unter den Bedingungen des Versuchs findet keine Beeinflussung der Spaltung statt. Abseits vom Optimum ist hingegen eine deutliche Förderung zu beobachten, die mit der Steigerung der As_2O_3-Konzentration ansteigt.

Versuch 2: 28 g Leberbrei mit 220 ccm destillierten Wassers zur Suspension. Anordnung der Kölbchen und der Pufferlösungen wie im Arsenversuch 1. Die As_2O_3-Konzentrationen waren im Kolben 1: 1,5 Proz. (7,6 . 10^{-2} mol.); 2: 0,67 Proz. (3,38 . 10^{-2} mol.); 3: 0,0067 Proz. (3,38 . 10^{-4} mol.); 4: destilliertes Wasser.

In 5 ccm der Suspension 5,57 mg Gesamt-N, 0,42 mg Rest-N.

[1]) Vgl. hierzu besonders *G. Izar*, diese Zeitschr. 21, 46, 1909; *E. Laqueur* und *J. Ettinger*, l. c., S. 1.

A.

Kolben	1	2	3	4
Rest-N, mg nach 4 Std.	1,82	1,84	2,19	2,16
„ „ „ 24 „	2,78	3,34	3,41	3,29
Rest-N in Proz. d. Ges.-N nach 4 Std.	32,7	34,8	39,0	38,9
„ „ „ „ „ „ 24 „	50,0	60,0	60,3	59,2
p_H (elektr.)	—	—	—	3,65

B.

Kolben	1	2	3	4
Rest-N, mg nach 4 Std.	0,99	1,01	1,15	1,05
„ „ „ 24 „	1,78	1,92	2,04	1,96
Rest-N in Proz. d. Ges.-N nach 4 Std.	17,8	18,2	20,7	18,8
„ „ „ „ „ „ 24 „	32,0	34,6	36,6	35,2
p_H (elektr.)	—	—	—	4,62

Im Optimum (Reihe A) zeigt sich hier bei der höchsten Konzentration (m/13) eine deutliche Hemmung der Proteolyse, bei der nächst niedrigeren (m/33) verringert sich die Geschwindigkeit der Spaltung ein wenig. Abseits vom Optimum zeigt die höchste Konzentration (m/13) eine eben merkliche Hemmung. Im ganzen ist die Beeinflußbarkeit der Proteolyse durch das As_2O_3 unter den angegebenen Bedingungen nur gering.

Bei dem nächsten Versuch kamen As_2O_3 und As_2O_5 zur Verwendung. Es sollte die Beeinflussung der ungepufferten Autolyse studiert werden.

Versuch 3: 137 g Leberbrei mit 180 ccm destillierten Wassers zur Suspension. 20 ccm dieser Suspension mit 10 ccm Arsenlösung und 10 ccm destillierten Wassers in jedes Kölbchen. Keine Pufferlösung.

Höhere As_2O_3-Konzentrationen (1,5 und 0,67 Proz.) verschieben stark den p_H; noch stärker höhere As_2O_5-Konzentrationen (1,5 und 0,67 Proz.).

Die Messungen ergaben (nach 24stündiger Autolyse bei 20°):

As_2O_3.	Kölbchen 1:	1,5	Proz.	p_H 3,55
	„ 2:	0,67	„	p_H 5,18
	„ 3:	0,0067	„	p_H 6,82
	„ 4:	0,00067	„	p_H 6,87
As_2O_5.	„ 5:	1,5	„	p_H 1,91
	„ 6:	0,67	„	p_H 3,46
	„ 7:	0,0067	„	p_H 6,77
	„ 8:	0,00067	„	p_H 6,73
	„ 9:	dest. Wasser, ohne Arsen		p_H 6,50

Die Analysen der Kölbchen 1, 2, 5 und 6 sind für vergleichende Beurteilung der Arsenwirkung nicht verwendbar; wohl aber die der Kölbchen 3, 4, 7 und 8.

In 5 ccm der Suspension 4,39 mg Gesamt-N, 0,34 mg Rest-N.

Kolben	As_2O_3 3	As_2O_3 4	As_2O_5 7	As_2O_5 8	Dest. Wasser 9
Rest-N, mg nach 4 Std.	0,47	0,52	0,62	0,51	0,36
„ „ „ 24 „	1,15	1,07	—	—	1,23
Rest-N in Proz. d. Ges.-N nach 4 Std.	10,9	12,0	14,3	11,7	8,1
„ „ „ „ „ „ 24 „	28,5	28,5	—	—	28,0
p_H (elektr.)	6,82	6,87	6,77	6,73	6,50

Arsentrioxyd und Arsenpentoxyd haben in höheren Konzentrationen die Acidität des Leberbreies so stark verändert, daß die Zahlen nicht zum Vergleich herangezogen werden können. Bei den niedrigsten Konzentrationen ist dies jedoch möglich, und da ergibt sich für die ersten Stunden der Autolyse eine Beschleunigung des Verlaufs der Spaltung. Nach 24 Stunden besteht kein Unterschied mehr gegenüber den Wasserwerten.

In dem folgenden Versuche wurden die Lösungen von As_2O_3 und As_2O_5 vor ihrer Anwendung mit Natronlauge genau neutralisiert (gegen Lackmus).

Versuch 4: 15,5 g Leberbrei mit 220 ccm destillierten Wassers. Anordnung wie im vorherigen Versuch.

In 5 ccm der Suspension 5,28 mg Gesamt-N, 0,39 mg Rest-N.

Kolben	As_2O_3 1	As_2O_3 2	As_2O_5 5	As_2O_5 6	Dest. Wasser 9
Rest-N, mg nach 4 Std.	0,48	0,47	0,58	0,53	0,71
„ „ „ 24 „	0,79	0,72	0,74	0,78	1,14
Rest-N in Proz. d. Ges.-N nach 4 Std.	9,1	9,0	11,1	10,1	13,5
„ „ „ „ „ „ 24 „	15,0	13,8	14,0	14,9	21,6
p_H (elektr.)	—	6,73	—	6,84	7,03

Es gelang in diesem Versuche, die H-Ionenzahl fast gleich zu halten, und da zeigte sich auch bei der ungepufferten Autolyse die schon vom Versuch 1 und 2 her bekannte hemmende Wirkung des Arsens in den hohen Konzentrationen.

Versuch 5: 13,5 g Leberbrei mit 180 ccm destillierten Wassers. Anordnung der Kölbchen wie in den vorherigen Versuchen. Keine Pufferung. Die Arsenlösungen vorher mit Natronlauge gegen Lackmus neutralisiert.

In 5 ccm der Suspension Gesamt-N 4,508 mg, Rest-N 0,262 mg.

A. As_2O_3-Lösung. Konzentration im Kolben 1: 1,5 Proz. (7,6 . 10^{-2} mol.); 2: 0,67 Proz. (3,38 . 10^{-2} mol.); 3: 0,0067 Proz. (3,38 . 10^{-4} mol.); 4: 0,00067 Proz. (3,38 . 10^{-5} mol.); 5: destilliertes Wasser.

Kolben	1	2	3	4	5
Rest-N, mg nach 4 Std.	0,40	0,39	0,45	0,47	0,44
„ „ „ 24 „	0,62	0,68	0,84	0,80	0,78
Rest-N in Proz. d. Ges.-N nach 4 Std.	8,9	8,7	10,0	10,3	9,9
„ „ „ „ „ „ 24 „	13,8	15,0	18,6	17,7	17,0
p_H (elektr.)	—	—	6,89	6,94	—

B. As_2O_5-Lösung. Konzentration im Kolben 5: 0,67 Proz. (2,9 . 10^{-2} mol.); 6: 0,0067 Proz. (2,9 . 10^{-4} mol.); 7: 0,00067 Proz. (2,9 . 10^{-5} mol.); 8: destilliertes Wasser.

Kolben	5	6	7	8
Rest-N, mg nach 4 Std.	0,43	0,53	0,44	0,44
„ „ „ 24 „	0,66	1,09	0,94	0,78
Rest-N in Proz. d. Ges.-N nach 4 Std.	9,6	11,1	9,8	9,9
„ „ „ „ „ „ 24 „	14,7	24,3	21,0	17,0
p_H (elektr.)	—	—	6,91	6,91

Auch dieser Versuch spricht in gleichem Sinne wie die vorhergehenden und zeigt auch für die ungepufferte Autolyse die (sehr) schwach fördernde Wirkung minimaler Arsenmengen.

Zum Schluß wurde eine Reihe von Versuchen mit FNa angestellt in gepufferten Lösungen.

Versuch 1: 18 g Leberbrei werden mit 200 ccm destillierten Wassers suspendiert; 20 ccm dieser Suspension werden in je ein Kölbchen getan, dazu kommen 10 ccm Pufferlösung und 10 ccm FNa-Lösung bzw. destilliertes Wasser. Die endgültigen FNa-Konzentrationen betragen n/12, n/60 und n/400. Die Pufferung besteht aus Milchsäure: milchsaurem Natrium (n/20 Endkonzentration), in Reihe A p_H = 3,8, in Reihe B p_H = 5,00.

In 5 ccm Suspension Gesamt-N 5,84 mg, Rest-N 0,37 mg.

Reihe A.

Kolben	Dest. Wasser 1	n/12 FNa 2	n/60 FNa 3	n/400 FNa 4
Rest-N, mg nach 7 Std.	2,00	1,85	1,96	2,01
„ „ „ 24 „	2,90	2,75	2,79	2,89
Rest-N in Proz. d. Ges.-N n. 7 Std.	34,3	31,8	33,6	34,5
„ „ „ „ „ „ 24 „	49,7	47,1	47,9	49,4

Reihe B.

Kolben	Dest. Wasser 1	n/12 FNa 2	n/60 FNa 3	n/400 FNa 4
Rest-N, mg nach 7 Std.	1,14	1,16	1,22	1,29
„ „ „ 24 „	1,94	1,96	2,01	1,99
Rest-N in Proz. d. Ges.-N n. 7 Std.	19,5	20,7	21,7	22,2
„ „ „ „ „ „ 24 „	33,5	33,8	34,5	34,1

Eine Beeinflussung der Autolyse durch FNa ist aus diesen Versuchen nicht zu ersehen. Ein mit höheren Konzentrationen (n/4) angestellter Versuch täuschte eine geringe Hemmung vor, die jedoch auf eine Verschiebung des p_H von 3,86 auf 5,36 zurückgeführt werden konnte.

Zusammenfassung.

1. Während selbst länger dauernder Autolyse (bis 8 Tage) von Leber von Meerschweinchen erleidet die Gesamtmenge der höheren Fettsäuren (Neutralfett + freie Fettsäure) nur eine geringfügige (höchstens 20 proz.) Abnahme; meist — namentlich bei den Fettlebern — ist eine Änderung der Fettsäurewerte überhaupt nicht zu beobachten.

2. Unter vergleichbaren Bedingungen wurde der Einfluß pharmakologisch wichtiger Verbindungen — Natrium salicyl., Atoxyl, Chinin. hydrochlor., Arsensäure, arsenige Säure — auf die autolytische Eiweißspaltung untersucht. Natrium salicyl. wirkte in den angewandten Konzentrationen fördernd; Chinin. hydrochlor., dann die geprüften Arsenverbindungen förderten (in Übereinstimmung mit den Befunden früherer Autoren) in kleinen, hemmten in größeren Konzentrationen die Autolyse, Atoxyl erwies sich stets als hemmend.

Das Hefe-Zymocasein.

Von

Heinrich Lüers und Georg Nowak.

(Aus dem Laboratorium für angewandte Chemie der Technischen Hochschule München.)

(Eingegangen am 26. November 1924.)

Von den Stickstoffsubstanzen des Hefezellsaftes sind in neuerer Zeit von *Pierre Thomas*[1]) und *A. Fodor*[2]) zwei Proteine isoliert und näher beschrieben worden. Das eine ist ein typisches Albumin, von *Thomas* Cerevesin benannt, das andere ein Phosphorprotein (*Fodor*), von *Thomas* wegen seiner Ähnlichkeit mit dem tierischen Casein Zymocasein bezeichnet. Während wir über die physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser beiden wichtigen Hefeproteine durch die Arbeiten von *Fodor*, ferner von *H. Lüers* und *K. Schuster*[3]) bereits gut unterrichtet sind, liegen über ihre chemische Zusammensetzung nur spärliche Mitteilungen vor.

J. Bayer[4]) führte von den beiden, nicht besonders rein dargestellten Proteinen Hydrolysen nach *van Slyke* durch, während *Thomas* die Hexonbasenfraktion quantitativ analysierte. Dagegen fehlt uns noch ein genauerer Einblick in die Verteilung des Stickstoffs auf die übrigen Aminosäuren[5]). Eine eingehende Kenntnis des Aufbaues dieser Proteine, insbesondere des Zymocaseins, liegt im allgemeinen wissenschaftlichen Interesse. Sie ist aber weiterhin für die Frage, wie der niedere pflanzliche Organismus seine Plasmaproteine aufzubauen vermag, von Bedeutung. Die Hefe stellt überdies ein besonders günstiges Versuchsmaterial dar: ist sie doch in beliebiger Menge in reinem Zustande zugänglich.

---

[1]) *P. Thomas*, Recherch. biochim. sur les proteiques de la levure. Paris, Laval, 1919.

[2]) *A. Fodor*, Kolloid-Zeitschr. **27**, 58, 1920; **29**, 20, 1921.

[3]) *H. Lüers* und *K. Schuster*, ebendaselbst **32**, 5, 1923.

[4]) *J. Bayer*, Dissertation, Technische Hochschule München.

[5]) Siehe auch *C. Neuberg*, Einiges über Hefeneiweiß. Wochenschr. f. Brauerei 1915, Nr. 38.

Das Ziel vorliegender Arbeit war, das Zymocasein in größerer Menge aus Hefe möglichst rein darzustellen und es einer Hydrolyse zu unterwerfen. Zur Identifizierung und Trennung der Hydrolysenprodukte brachten wir eine Kombination mehrerer, zum Teil erst in jüngerer Zeit aufgekommener Methoden zur Anwendung.

Experimentelles.

a) Darstellung des Hefe-Zymocaseins.

Mit Rücksicht auf die großen Mengen zu verarbeitender Hefe und um möglichst rasch und zweckmäßig verfahren zu können, wurde die Darstellung des Zymocaseins im Betriebe und Laboratorium der Franziskaner Leistbräu A.-G., München, der wir für ihr Entgegenkommen zu großem Dank verpflichtet sind, vorgenommen.

Die frisch vom Gärbottich kommende, mehrmals gründlich gewaschene Hefe wurde auf einer Presse abgepreßt. 126 kg der gepreßten, untergärigen Hefe wurden dann in zwei Portionen von 58 und 68 kg in folgender Weise weiter verarbeitet:

Die Hefe wurde im Gärkeller in einem großen Bottich mit 6 Proz. ihres Gewichts an Kochsalz innig durchgemischt und zur Plasmolyse gebracht. In einer Viertelstunde war die Verflüssigung der Hefe erreicht. Durch Einführen einer eisernen Heizschlange in den Bottich wurde dann die verflüssigte Masse auf 35° C erwärmt und 5 Stunden bei dieser Temperatur gehalten. Es trat starke Autolyse ein, so daß die Hefe schäumend bis an den Bottichrand anstieg. Sodann wurden ungefähr 2 kg Soda, gelöst in 80 bis 90 Liter Wasser von 35°, zugegeben, wodurch die Selbstgärung zum Stillstand kam und das Zymocasein in Lösung ging. Die Reaktion war eben schwach alkalisch. Nach einer Viertelstunde filtrierte man die gut durchgemischte Masse durch dichte, große Leinwandsäcke hindurch. Das opalisierende Filtrat wurde bis zur Neutralität mit Salzsäure und von da ab bis zur H-Ionenkonzentration von $p_H = 4,5$, die dem isoelektrischen Punkt des Zymocaseins entspricht, mit Essigsäure versetzt. Es trat ein starker, weißer, mit der Zeit rötlich werdender Niederschlag ein, der nach dem Ablaufen der Mutterlauge auf einer Filterpresse vollends abgepreßt wurde. Durch nochmaliges Auflösen in Natronlauge und Wiederfällen mit Essigsäure wurde das Zymocasein gereinigt. Um ihm eine möglichst große Oberfläche zu geben, wurde das Protein durch eine Kartoffelpresse hindurchgepreßt und die krümelige Masse auf Filtrierpapier an der Luft rasch zum Trocknen gebracht. Die anfangs weiße, käsige Masse nahm bald eine rötliche Färbung an, die nach dem Trockenwerden in Hellgelb überging. Aus 126 kg Preßhefe erhielten wir insgesamt 3030 g lufttrockenes Zymocasein.

Die allgemeine chemische Zusammensetzung des Zymocaseins war folgende:

Feuchtigkeit	21,67 Proz.
Aschengehalt	5,98 „
Proteinsubstanz (N · 6,25)	68,10 „
Ätherextrakt	0,51 „
Kohlehydrate	—
Nicht bestimmte Verbindungen . . .	3,74 „
Sa.	100,00 Proz.

b) Hydrolyse des Zymocaseins.

Zur Trennung der durch Salzsäurehydrolyse erhaltenen Abbauprodukte wandten wir eine Kombination der von *H. D. Dakin*[1]), *E. Fischer*[2]), *D. D. van Slyke*[3]) und *Kossel*[4]) angegebenen Methoden an. Die Verfahren der drei letztgenannten Autoren sind genügend bekannt. Die *Dakin*sche Methode zur Trennung und Isolierung der Aminosäuren beruht auf der Extraktion des Hydrolysats mit teilweise in Wasser löslichen Extraktionsmitteln, z. B. Isobutylalkohol, der sich in Wasser im Verhältnis 1 : 9 löst. Nach der *Dakin*schen Methode erhält man im allgemeinen folgende fünf Fraktionen:

1. Monoaminosäuren, durch Isobutylalkohol extrahierbar, darin aber unlöslich und sich abscheidend.
2. Prolin, durch Isobutylalkohol extrahierbar und darin löslich.
3. Polypeptide und Anhydride, durch Isobutylalkohol extrahierbar, darin löslich, trennbar vom Prolin durch ihre Unlöslichkeit in absolutem Alkohol.
4. Aminodicarbonsäuren (und etwas Glykokoll), nicht durch Isobutylalkohol extrahierbar.
5. Diaminosäuren und Purinbasen, nicht extrahierbar durch Isobutylalkohol, trennbar von 4. durch Phosphorwolframsäure.

Die Fraktion der Monoaminosäuren läßt sich nach *E. Fischers* Estermethode weiter aufarbeiten, die Hexonbasengruppe wird durch das *Kossel*sche oder *van Slyke*sche Verfahren differenziert, wobei das letztere auch den Cystinanteil ergibt. Das Tryptophan wird in einem gesonderten Versuch nach totaler Verdauung des Zymocaseins durch Trypsin ermittelt, da es bei der Hydrolyse selbst zu Verlust geht.

Einige Vorversuche sollten zunächst über die Bedingungen der möglichst vollständigen Hydrolyse des Zymocaseins Aufschluß geben.

---

[1]) *H. D. Dakin*, Journ. of biol. Chem. **47**, 499, 1920.

[2]) *E. Fischer*, Über die Hydrolyse des Caseins durch Salzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 151, 1901.

[3]) *D. D. van Slyke*, Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden **5**, 2.

[4]) *A. Kossel* und *F. Kutscher*, Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. **49**, 318, 1906.

Es zeigte sich, daß eine 30stündige Hydrolyse mit 20proz. Salzsäure am kochenden Wasserbade nicht ausreichte, das Molekül so weit aufzuspalten, daß eine nennenswerte Ausbeute an Monoaminosäuren durch Isobutylextraktion erhalten wurde. 30stündige Hydrolyse mit 25proz. Salzsäure führte bereits besser zum Erfolg, doch widerstanden auch unter diesen Bedingungen noch Polypeptide in erheblicher Menge der Aufspaltung. Das Ziel wurde aber vollends erreicht durch 30stündige Hydrolyse mit 38proz. Salzsäure.

200 g Zymocasein wurden auf dem kochenden Wasserbade unter Rückfluß hydrolysiert. Nach je zehnstündiger Erhitzung leitete man in der Kälte gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung ein und setzte das Erhitzen fort. Nach insgesamt 30stündiger Hydrolyse befreite man zuerst durch Einengen im Vakuum das Hydrolysat vom größten Teil der Salzsäure und vertrieb den Rest dann noch durch Wasserdampfdestillation. Die Hydrolysenlösung wurde jetzt mit Natronlauge neutralisiert, so daß sie auf Kongo alkalisch, auf Lackmus noch schwach sauer reagierte, auf ein Volumen von 500 ccm gebracht und der Gesamtstickstoff bestimmt. In zwei Portionen wurde dann im *Lindt*schen Extraktionsapparat unter Turbinierung der Flüssigkeit die Isobutylextraktion vorgenommen, bis die Lösung frei an extrahierbaren Verbindungen war, was nach 20 bis 25 Stunden jeweils der Fall war. Die extrahierten Monoaminosäuren schieden sich im Kochkolben in Form von Krusten aus und wurden täglich einmal abfiltriert. Die nach beendigter Extraktion noch im Isobutylalkohol gelösten Monoaminosäuren ließen sich durch starkes Einengen und Abkühlen zur Kristallisation bringen. Das Ergebnis der Extraktion sind folgende drei Hauptfraktionen:

1. In Isobutylalkohol lösliche Fraktion.
2. Von Isobutylalkohol extrahierte, aber darin sich ausscheidende Fraktion.
3. Die wässerige, mit Isobutylalkohol extrahierte Hydrolysatlösung.

Aufarbeitung der ersten Fraktion.

Diese Fraktion enthält im wesentlichen das Prolin. Nach Abdampfen des Isobutylalkohols auf 100 ccm gebracht, hatte die Lösung einen Gesamt-N von 0,9219 g und einen Amid-N von 0,0676 g; der Nichtamino-N von 0,8543 g entspricht dem Prolin-N. Auf den Gesamt-N des Hydrolysats berechnet, ergibt sich eine Menge von 4,18 Proz. Prolin-N. Die Identifizierung des Prolins erfolgte nach *Willstätter*[1]) über das Kupfersalz.

---

[1]) *Willstätter*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 33, 1160.

Wassergehalt des Prolinkupfers: 10,89 und 10,95 Proz.; berechnet 10,99 Proz.

Das wasserfreie Salz enthielt:

	Cu Proz.	N Proz.
Gefunden	21,85	8,41
Berechnet	21,78	8,55

Bei einer Behandlung des nach Verdampfung des Isobutylalkohols verbleibenden Rückstandes mit absolutem Alkohol konnten keine Polypeptide und Anhydride in fester Form zur Abscheidung gebracht werden.

Aufarbeitung der zweiten Fraktion.

Die Gesamtmenge der aus Isobutylalkohol abgeschiedenen Aminosäuren belief sich auf 20,45 g, mit einer Gesamt-N-Menge von 1,8334 g. Zur Veresterung wurden 15 g verwendet und genau nach den Angaben *E. Fischers* verarbeitet. Die fraktionierte Destillation im Hochvakuum lieferte folgende Fraktionen:

1. Fraktion bei 9 mm und 58° C; 1,7093 g Ester = 1,5645 g freie Aminosäuren (nach der Verseifung).
2. Fraktion bei 8 mm und 58 bis 65° C; 2,5112 g Ester = 2,2258 g freie Aminosäuren.
3. Fraktion bei 4 mm und 65 bis 85° C; 2,4753 g Ester = 2,3240 g freie Aminosäuren.
4. Fraktion bei 0,1 mm und 100 bis 130° C: 1,7527 g Ester = 1,5488 g freie Aminosäuren.

Die erste Fraktion hatte einen N-Gehalt von 15,70 Proz., sie besteht also aus reinem Alanin, das einen berechneten N-Gehalt von 15,73 Proz. aufweist. Eine Amidstickstoffbestimmung nach *van Slyke* ergab den Wert 15,72 Proz., ein weiterer Beweis für die Reinheit der Fraktion.

Die zweite Fraktion wurde durch fraktionierte Kristallisation in zwei Anteile differenziert.

1. Kristallisation: 0,0842 g. N = 15,57 Proz., für Alanin berechnet 15,73 Proz., so daß diese Kristallisation praktisch reines Alanin war.

2. Kristallisation: 2,012 g. N = 10,80 Proz., für Leucin berechnet 10,86 Proz.; es lag demgemäß reines Leucin vor. Amid-N = 10,72 Proz.

Die dritte Fraktion von 2,324 g besaß einen N = 10,29 Proz. Auch diese Fraktion stellt noch reines Leucin dar.

Die vierte Fraktion von 1,5488 g hatte einen N-Gehalt von 8,61 Proz., für Phenylalanin berechnet sich 8,48 Proz. Amid-N 8,60 Proz. Es lag also reines Phenylalanin vor.

Umgerechnet auf die Gesamtstickstoffmenge des Hydrolysats, ergeben sich folgende Anteile dieser Aminosäuren:

Alanin	1,73 Proz.
Leucin	3,18 „
Phenylalanin	0,87 „

Prüfung auf Oxyprolin.

Bei der Ausätherung der Aminosäureester nach *E. Fischer* bleibt der Ester des Oxyprolins im Brei der Carbonate zurück, aus dem er sich leicht isolieren läßt. Es gelang jedoch nicht, wägbare Mengen des Oxyprolinesters zu erhalten, so daß diese Aminosäure fehlt.

Tyrosinbestimmung.

5 g des Gemisches der rohen, unveresterten Monoaminosäuren wurden mit 25 ccm Eisessig zum Kochen erhitzt und mit 25 ccm Alkohol versetzt. Der abfiltrierte und mit alkoholischer Essigsäure ausgewaschene Rückstand wurde dann mit 10 ccm Wasser gekocht und die beim Abkühlen sich ausscheidenden Kristalle abfiltriert (2,0688 g).

N gefunden 7,71 Proz.; N für Tyrosin berechnet 7,23 Proz.

Nachdem besonders durch Phenylalanin das Tyrosin in Lösung gehalten wird, wurden die vereinigten Filtrate der Tyrosindarstellung neutralisiert und nach *H. D. Dakin*[1]) mit Kaliumcyanat behandelt, um die Uraminosäuren des Leucins und Phenylalanins zur Abscheidung zu bringen. Das Filtrat wird zur Extraktion der Tyrosin-Uraminosäure mit Äther 3 Tage lang extrahiert und diese mit heißer verdünnter Salzsäure in das schwer lösliche p-Oxybenzylhydantoin übergeführt. Die Ausbeute an Hydantoin war zu gering, als daß sie hätte berücksichtigt werden können. Umgerechnet auf den Gesamt-N, ergibt sich ein Tyrosin-N zu 2,37 Proz.

Die wässerige, mit Isobutylalkohol extrahierte Hydrolysatlösung.

Die mit Isobutylalkohol erschöpfte wässerige Lösung wurde auf 500 ccm aufgefüllt. Die Gesamtstickstoffmenge betrug 14,9821 g. 200 ccm einer verdünnten Lösung davon, mit 0,3612 g N, wurden zur Trennung der Hexonbasen nach *D. D. van Slyke* benutzt (Urlösung). 150 ccm (Urlösung) auf 200 ccm aufgefüllt und das Ammoniak daraus abdestilliert, lieferten 0,04742 g Ammoniak-N in 200 ccm Urlösung oder = 9,26 Proz. des Gesamt-N.

An Melanin-N wurden erhalten 0,01149 g in 200 ccm Urlösung = 2,25 Proz. auf Gesamt-N berechnet.

Cystin-N:	0,0036 g in 200 ccm Urlösung	=	0,74 Proz. des Gesamt-N
Arginin-N:	0,04326 g „ 200 „ „	=	3,47 „ „ „
Histidin-N:	0,0143 g „ 200 „ „	=	2,80 „ „ „
Lysin-N:	0,05236 g „ 200 „ „	=	10,25 „ „ „

[1]) *H. D. Dakin*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **130**. 159—168, 1923.

Sämtliche Werte der Hexonbasen wurden unter genauer Befolgung der *van Slyke*schen Methode und Berücksichtigung aller Löslichkeits- und Blindversuchskorrekturen erhalten.

Bestimmung von Glutaminsäure, Asparaginsäure und Glykokoll.

Diese drei Aminosäuren sind ebenfalls in dieser Fraktion, und zwar im Filtrat des Phosphorwolframsäureniederschlages enthalten. In 100 ccm der mit Isobutylalkohol extrahierten wässerigen Hydrolysenlösung wurden die Hexonbasen mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, auf 100 ccm gebracht und der Gesamt-N ermittelt. Nach starkem Alkalischmachen mit $Ba(OH)_2$ wurde das vorhandene Ammoniak vertrieben und der Niederschlag abfiltriert; eine Trennung der im alkalischen Filtrat enthaltenen Bariumsalze der Aminodicarbonsäuren von Glycin wird durch Ausfällen der stark konzentrierten Lösung (100 ccm) mit einem großen Überschuß 95proz. Alkohols (1 Liter) erreicht. Die ausgefällten und gewaschenen Ba-Salze der Dicarbonsäuren wurden mit Schwefelsäure quantitativ zerlegt, das Filtrat vom Bariumsulfatniederschlag stark eingeengt und mit Salzsäuregas in der Kälte gesättigt. Nach Absaugen der ersten Ausbeute an Glutaminsäurechlorhydrat erhielt man durch neuerliches Sättigen mit gasförmiger Salzsäure und Stehenlassen der Lösung über Nacht in einer Kältemischung eine Nachausbeute von Glutaminsäurechlorhydrat mit Bariumchlorid. Aus dem N-Gehalt, der durch eine Amidstickstoffbestimmung kontrolliert wurde, ergab sich die Gesamtmenge an Glutaminsäure-N zu 0,7968 g oder, auf den Totalhydrolysen-N bezogen, zu 19,5 Proz.

Durch genaue Neutralisation des nochmals in Lösung gebrachten Glutaminsäurechlorhydrats wurde die Säure in Freiheit gesetzt und in schönen spießigen Kristallen erhalten. Die getrocknete Substanz ergab einen N-Gehalt von 9,44 Proz., einen Amid-N-Gehalt von 9,75 Proz., während der berechnete = 9,52 Proz. ist. Es lag also reine Glutaminsäure vor.

Das Filtrat des Glutaminsäurechlorhydrats wird im Vakuum eingedampft, der Sirup mit 10 Teilen heißen Wassers aufgenommen und nach *Foremann*[1]) auf Asparaginsäure verarbeitet. Es wurden jedoch nur Spuren dieser Säure erhalten.

Bei der Ausfällung der Bariumsalze der Glutamin- und Asparaginsäure bleibt das Bariumsalz des Glykokolls in der alkoholischen Mutterlauge. Nach Konzentrierung wird das Barium quantitativ als Sulfat abgeschieden, das Filtrat zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit absolutem Alkohol und trockenem Salzsäuregas verestert. Bei

[1]) *Foremann*, diese Zeitschr. 8, 463.

starker Abkühlung scheidet sich das Esterchlorhydrat des Glykokolls ab, aus dem dann auf bekannte Weise die reine Aminosäure dargestellt wurde. An reinem Glykokoll wurden erhalten 1,615 g = 0,3014 g N oder in Prozenten des Gesamthydrolysen-N = 7,37 Proz.

Analyse des Glykokolls: N = gefunden 18,58 Proz., Amid-N = 18,23 Proz., berechnet 18,66 Proz.

Tryptophanbestimmung.

Da das Tryptophan bei der Hydrolyse zu Verlust geht, wurde es in einem gesonderten Versuch durch Pankreasverdauung ermittelt. 150 g Zymocasein, suspendiert in 2 Liter 0,8proz. Sodalösung, wurden mit 3 g Pankreatin unter Toluol bei 36^0 verdaut. Nach 6 Tagen wurde die Lösung mit Kieselgur versetzt, um das Filtrieren zu erleichtern, und nach Abkühlung filtriert. Nach Ansäuern mit H_2SO_4 wird mit schwefelsaurer Quecksilbersulfatlösung gefällt und der Niederschlag mit H_2S zerlegt. Die Lösung wird erneut, und zwar fraktioniert mit Quecksilbersulfat gefällt, um zuerst das Cystin abzuscheiden. Der zweite, bei Zusatz überschüssigen Quecksilbersulfats erhaltene Niederschlag wird wieder mit H_2S zerlegt, das Filtrat mit $Ba(OH)_2$ quantitativ von Schwefelsäure befreit und das Filtrat vom Bariumsulfat im Vakuum bis zur Ausscheidung des Tryptophans eingeengt. Erhalten 1,8202 g reines Tryptophan mit 0,2486 g N = 1,48 Proz. des Gesamt-N.

Analyse des Tryptophans: Gesamt-N = 13,65 Proz., Amid-N = 6,93 Proz.; berechnet Gesamt-N = 13,72 Proz., Amid-N = 6,86 Proz.

Unmittelbare Isolierung und Bestimmung des Histidins, Arginins und Lysins nach Kossel und Kutscher.

Die nach der *van Slyke*schen Methode durchgeführte Bestimmung der Hexonbasen kann zu Fehlern Anlaß geben, wenn die Hydrolyse keine vollständige war. Um sicher zu gehen, führten wir noch eine Trennung und quantitative Bestimmung des Arginins, Histidins und Lysins nach dem bekannten und vielfach bewährten Verfahren von *Kossel* und *Kutscher* durch. Zu diesem Zwecke wurden 300 ccm der mit Isobutylalkohol extrahierten Lösung zuerst nach *van Slyke* von Ammoniak- und Humin-N befreit, sodann nach Behandlung mit Tierkohle und Ansäuern mit Schwefelsäure Histidin und Arginin mit Silbersulfat gefällt und mit Bariumcarbonat getrennt.

Die Histidinfraktion enthielt 0,4332 g N, auf Totalhydrolysen-N berechnet 3,53 Proz. Histidin-N. Die Identifizierung erfolgte in Form des Di-Pikrolonats. Das getrocknete, schön gelbe Histidindipikrolonat hatte einen N-Gehalt von 22,41 Proz.

Berechnet für $C_6H_9N_3O_2 \cdot 2\,C_{10}H_8N_4O_5$ = 22,54 Proz.

Die Argininfraktion besaß einen N-Gehalt von 1,0279 g, entsprechend 8,39 Proz. Arginin-N, auf Total-N bezogen.

Das Di-Pikrolonat ergab einen N-Gehalt von 23,71 Proz.

Für $C_2H_{14}O_2N_4 \cdot 2\,C_{10}H_8N_4O_5$ berechnet 23,76 Proz.

Aus dem Filtrat der Histidin- und Argininsilbersalze wurde das Lysin über das Phosphorwolframat abgeschieden.

N-Gehalt der Lysinfraktion = 1,4036 g = 11,45 Proz. des Gesamthydrolysen-N. Die Identifizierung erfolgte als Pikrat.

Das umkristallisierte, gelbe Lysinpikrat ergab N = 18,59 Proz. Für $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$ berechnet, N = 18,66 Proz.

Purinbasen.

Nachdem bei der Herstellung des Zymocaseins die Möglichkeit nicht ausgeschlossen war, daß in die Fällung auch Hefenucleinsäure mit einging, somit Purinbasen in größerer Menge im Hydrolysat enthalten waren, wurden diese nach *K. Miko*[1]) mit Cu-Bisulfit aus 50 ccm des extrahierten Hydrolysats ausgefällt.

Auf Gesamthydrolysen-N umgerechnet, ergab sich jedoch nur eine Menge von 0,6 Proz. Purinbasen-N, ein Zeichen dafür, daß das Zymocasein nur sehr geringe Mengen an Nucleinsäure enthalten hatte.

Zusammenstellung der Versuchsergebnisse.

	Gesamt-N Proz.		
Glykokoll-N	7,37		
Alanin-N	1,72		
Valin-N	—		
Leucin-N	3,18		
Isoleucin-N	—		
Phenylalanin-N	0,87		
Tyrosin-N	2,37		
Serin-N	—		
Cystin-N	0,74		
Prolin-N	4,18		
Oxyprolin-N	—		
Asparaginsäure-N	+		
Glutaminsäure-N	19,50		
Tryptophan-N	1,48		
Arginin-N	8,39	8,47	nach *van Slyke*
Lysin-N	11,45	10,25	nach *van Slyke*
Histidin-N	3,53	2,8	nach *van Slyke*
Ammoniak-N	9,26		
Melanin-N	2,25		
Purinbasen-N	0,60		
	77,06		

[1]) *K. Miko*, Zeitschr. f. Unters. der Nahrungs- u. Genußmittel **5**, 193. 1902.

In der folgenden Tabelle ist die Analyse des Zymocaseins mit Analysen des tierischen Caseins[1]), des Vitellins[1]) und des Legumins der Erbse[1]) in Vergleich gesetzt.

Aminosäure	Casein I	Casein II	Zymocasein	Vitellin	Legumin
Glykokoll	—	—	7,37	—	0,4
Valin	7,2	6,26	—	1,9	—
Alanin	1,5	1,5	1,73	0,8	2,1
Leucin	9,4	6,4	3,18	9,9	8,0
Phenylalanin	3,2	1,74	0,87	2,6	3,8
Tyrosin	4,5	2,24	2,37	3,4	1,6
Prolin	6,7	5,2	4,18	4,2	3,2
Arginin	3,8	7,77	8,39	7,5	11,7
Cystin	0,1	?	0,74	—	—
Histidin	2,5	5,64	3,53	1,9	2,4
Lysin	6,0	7,35	11,45	4,8	5,0
Glutaminsäure	15,6	9,47	19,52	13,0	17,0
Asparaginsäure	1,4	0,94	+	2,2	5,3
Tryptophan	1,5	1,31	1,48	+	+
Serin	0,5	0,4	—	—	0,5
Ammoniak	1,6	1,6	9,26	1,3	2,1
Melanin	—	—	2,25	—	—
Purinbasen	—	—	0,6	—	—
	66,6	57,33	77,06	53,3	63,1

Ein Vergleich dieser Gegenüberstellungen führt zu folgendem Ergebnis:

Casein und Vitellin sind frei von Glykokoll, Legumin enthält nur wenig davon, dagegen weist Zymocasein diese Aminosäure in beträchtlicher Menge auf.

Alanin, Tyrosin, Tryptophan und Arginin ist bei allen diesen Proteinen in etwa gleicher Menge vorhanden. Kleine Abweichungen zeigen das Phenylalanin, Prolin, Histidin und Cystin. Charakteristisch und ausschlaggebend für die Eigenart des Zymocaseins ist sein hoher Gehalt an Glutaminsäure und Ammoniak. Das letztere kann in Säureamidform im Zymocaseinmolekül, gebunden an Glutaminsäure, eventuell angenommen werden. Dem Casein und Zymocasein fehlt das Isoleucin; dem letzteren ferner noch das Valin. Dagegen fällt hier der hohe Lysingehalt gegenüber den anderen Proteinen in die Augen.

[1]) *Plimmer-Matula*, Die chemische Konstitution der Eiweißkörper 1914.

Aus allem geht hervor, daß das Zymocasein sich ohne Zwang in die Gruppe der Phosphorproteine einreihen läßt. Es steht, wie das *Thomas* auf Grund der physikalisch-chemischen Eigenschaften bereits behauptete, auch durch seine Zusammensetzung dem tierischen Casein näher als dem Vitellin oder dem pflanzlichen Legumin. Durch seinen charakteristischen Gehalt an Glutaminsäure-, Lysin-, Glykokoll- und Ammoniak-N erweist es sich jedoch als ein selbständiges, für die Hefe charakteristisches Protein.

Zugleich zeigt diese ausführliche Analyse des Zymocaseins, daß der niedere pflanzliche Organismus ebenso wie die höher organisierte Pflanze oder der tierische Organismus seine Plasmaproteine in gleich vollkommener Form aufzubauen vermag.

Studien über Cholesterin und seine Ester.

Von

E. Keeser.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 26. November 1924.)

I.

Trotz zahlreicher Arbeiten über die Frage nach der physiologischen und pharmakologischen Bedeutung des Cholesterins sind unsere Kenntnisse über die Art seiner Wirkungen noch recht unvollkommen. Im Organismus befinden sich an den Stellen, an denen Cholesterin vorhanden ist, immer auch Phosphatide, so daß meist diese beiden Körper unter dem Begriff „Lipoide" zusammengefaßt werden, obwohl das Cholesterin kein Fettkörper, sondern ein einwertiger ungesättigter sekundärer Alkohol ist. Der Gedanke lag nun nahe, daß diese beiden Substanzen den Dispersitätsgrad der Biokolloide in entgegengesetztem Sinne beeinflussen, etwa so, daß das Lecithin, das stärker hydrophil als das Cholesterin ist, schützend, das Cholesterin dagegen sensibilisierend wirkt. Aus diesem Grunde prüfte ich zunächst den Einfluß eines Cholesterin- bzw. Lecithinsols auf die Fällbarkeit eines negativ geladenen Schwefel- bzw. Arsentrisulfidsols. Für meine Versuche wählte ich aus dem Grunde negative Sole, weil 1. bei der $[H^{\cdot}]$ des Organismus die Biokolloide — also nicht nur die Eiweißkörper, sondern auch das Lecithin — negativ geladen sind, 2. auch das Cholesterin ein Kolloid mit anodischer Konvexion darstellt (s. unten).

Zunächst bildete die Herstellung eines guten Cholesterinsols technische Schwierigkeiten, da die in der Literatur angegebenen Darstellungsverfahren nur mehr oder weniger grobe Cholesterinsuspensionen liefern, die sich — zumal für quantitative Untersuchungen — sehr schlecht eignen. Nach *Stuber* (1) bilden Ölsäure- und Palmitinsäurecholesterinester haltbare Emulsionen, wenn sie, in Aceton gelöst, tropfenweise unter starkem Schütteln in heißes Wasser eingetragen werden. Noch bessere Ergebnisse erhielt ich nach folgendem Verfahren: Wenn man in heißem Alkohol gelöstes Cholesterin langsam in kochendes Wasser unter stetem Umrühren einträgt, so entsteht ein sehr stabiles

Sol, das im Ultramikroskop lebhaft bewegte Stäbchen zeigt. Desgleichen erhält man ein vollständig klares Lecithinsol, wenn man in Alkohol gelöstes Lecithin in kochendes Wasser einträgt. — Die unten mitgeteilten Versuche stellte ich mit einem gegen Elektrolytzusatz sehr empfindlichen Schwefel- und einem stabileren Arsentrisulfidsol der Köln-Rottweil A.-G. an.

ccm Schwefelsol	5,0	5,0	5,0	5,0
+ „ Aqua dest.	0,6	0,7	0,8	0,9
+ „ m KCl	0,4	0,3	0,2	0,1
1. + 5 ccm Aqua dest.	+	+	—	—
2. + 5 „ Cholesterinsol	+	+	+	—
3. + 5 „ Lecithinsol	+	+	+	+

ccm Schwefelsol	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
+ „ Aqua dest.	0,7	0,8	0,85	0,9	0,95
+ „ m/2 $CaCl_2$	0,3	0,2	0,15	0,1	0,05
1. + 5 ccm Aqua dest.	++	+	+	—	—
2. + 5 „ Cholesterinsol	++	++	+	+	—
3. + 5 „ Lecithinsol	++	++	++	++	+

ccm Arsentrisulfidsol	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
+ „ Aqua dest.	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	0,9
+ „ m/2 $CaCl_2$	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1
1. + 5 ccm Aqua dest.	++	+	—	—	—	—
2. + 5 „ Cholesterinsol	++	+	+	±	—	—
3. + 5 „ Lecithinsol	++	++	++	++	++	+

Die Versuche zeigen, daß sowohl Cholesterin als auch Lecithin sensibilisierend auf negativ geladene Kolloide wirken.

II.

Nun findet sich Cholesterin im Organismus nicht nur in freier Form, sondern auch als Ester. Nach *Bang* (2) enthält z. B. menschliches Blut 0,07 Proz. Cholesterin und 0,12 bis 0,2 Proz. Cholesterinester; nach *Bloor* und *Knudson* (3) ist das Verhältnis von freiem Cholesterin zu Cholesterinester im Blute beim normalen Menschen konstant, während nach *Kauders* (4) normale Menschensera bedeutende Schwankungen in bezug auf beide Formen des Cholesterins aufweisen. Diese wenigen angeführten Beobachtungen zeigen, welches Interesse eine Untersuchung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Ester des Cholesterins besitzt, um so mehr, als das Cholesterin sehr leicht Bindungen eingeht.

Die Darstellungsarten der Ester des Cholesterins sind durch die Arbeiten von *Windaus* (5) u. a. wohlbekannt; die physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser Körper sind außerordentlich interessant und von *P. v. Weimarn* (6) sowie *Gaubert* (7) zu Untersuchungen

über die Eigenschaften der sogenannten flüssigen Kristalle verwendet worden. Heute wissen wir aus den Untersuchungen von *Friedel* (8), daß die cholesterinartigen Verbindungen Stoffe in mesomorphem Zustande sind, der einen Zwischenzustand zwischen der kristallisierten und amorphen Phase darstellt und eine bessere Lösefähigkeit als der kristallisierte besitzt.

Nach den angegebenen Vorschriften stellte ich Cholesterylformiat, -acetat, -butyrat, -benzoat und -palmitat her und untersuchte den Einfluß von äquimolaren Lösungen dieser Ester (½ millimolar) auf die oben genannten Kolloide.

ccm Schwefelsol	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
+ „ Aqua dest.	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8
+ „ m KCl	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2
1. + 5 ccm Aqua dest.	+	+	+	—	—
2. + 5 „ Cholesterinsol	+	+	+	+	+
3. + 5 „ Cholesterylacetatsol	+	+	+	±	—
4. + 5 „ Cholesterylpalmitatsol	+	+	—	—	—

ccm Arsentrisulfidsol	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
+ „ Aqua dest.	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	0,9
+ „ m/2 $CaCl_2$	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1
1. + 5 ccm Cholesterinsol	++	++	+	+	+	+
2. + 5 „ Cholesterylacetatsol	+	+	+	+	—	—
3. + 5 „ Cholesterylpalmitatsol	+	+	±	—	—	—

ccm Schwefelsol	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
+ „ Aqua dest.	0,0	0,4	0,8	1,2	1,6	1,8
+ „ m KCl	2,0	1,6	1,2	0,8	0,4	0,2
1. + 5 ccm Cholesterinsol	++	++	+	+	+	—
2. + 5 „ Cholesterylbutyratsol	+	+	+	±	—	—
3. + 5 „ Cholesterylbenzoatsol	+	+	±	—	—	—

ccm Arsentrisulfidsol	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
+ „ Aqua dest.	0,2	0,4	0,6	0,7	0,8	0,9
+ „ m/2 $CaCl_2$	0,8	0,6	0,4	0,3	0,2	0,1
1. + 5 ccm Cholesterinsol	++	++	++	++	++	++
2. + 5 „ Cholesterylbenzoatsol	+	+	+	+	—	—
3. + 5 „ Cholesterylpalmitatsol	+	+	±	—	—	—

ccm Arsentrisulfidsol	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
+ „ Aqua dest.	0,0	0,2	0,4	0.6	0,8
+ „ m/2 $CaCl_2$	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2
1. + 5 ccm Cholesterinsol	++	++	++	++	++
2. + 5 „ Cholesterylbutyratsol	++	+	+	±	—
3. + 5 „ Cholesterylpalmitatsol	+	+	±	—	—

Die Versuche zeigen, daß die homologe Reihe der Fettsäureester des Cholesterins mit zunehmender Kohlenstoffkette abnehmend stark

sensibilisiert, so daß das Cholesterylpalmitat gegen einwertige Elektrolyte schützend wirkt, während seine Schutzwirkung gegen zweiwertige Elektrolyte weniger stark ist.

III.

Nach der Ursache dieser abnehmend sensibilisierenden Wirkung der Cholesterinester suchend, prüfte ich zunächst die Oberflächenaktivität ihrer äquimolaren Lösungen. Während die Tropfenzahl des angewandten Stalagmometers für Wasser 35,15 betrug, zeigten millimolare Sole von Cholesterin eine solche von 52, von Cholesterylacetat eine von 47,3 und von Cholesterylpalmitat eine von 41,5 Tropfen. Um noch deutlichere Unterschiede zu erhalten, stellte ich stärker konzentrierte Sole von zweifacher Millimolarität her und erhielt folgende Werte:

Wasserwert des Stalagmometers	42,3 Tropfen
Cholesterinsol	68,5 ,,
Cholesterylacetatsol	65,3 ,,
Cholesterylbenzoatsol	61,0 ,,
Cholesterylpalmitatsol	54,2 ,,

Die Oberflächenaktivität ist nach *I. Traube* ein Ausdruck für die Größe des Haftdrucks einer Substanz. Deshalb bestimmte ich zur Kontrolle der stalagmometrisch erhaltenen Werte die Affinität der genannten Sole zu Wasser, indem ich ihren Fällungswert gegenüber m/2 KCl bestimmte.

ccm Aqua dest. / + „ m/2 KCl	0,5 / 2,5	1,0 / 2,0	1,5 / 1,5	2,0 / 1,0	2,1 / 0,9	2,2 / 0,8	2,3 / 0,7
1. + 5 ccm Cholesterinsol	++	++	++	++	++	++	++
2. + 5 „ Cholesterylformiatsol	++	++	++	++	++	++	++
3. + 5 „ Cholesterylacetatsol	++	++	++	++	++	++	++
4. + 5 „ Cholesterylbenzoatsol	++	++	++	+	+	+	+
5. + 5 „ Cholesterylpalmitatsol	+	±	—	—	—	—	—

ccm Aqua dest. / + „ m/2 KCl	2,4 / 0,6	2,5 / 0,5	2,6 / 0,4	2,7 / 0,3	2,8 / 0,2	2,9 / 0,1	2,95 / 0,05	2,99 / 0,01
1. + 5 ccm Cholesterinsol	++	++	++	++	++	++	+	—
2. + 5 „ Cholesterylformiatsol	++	++	++	++	+	—	—	—
3. + 5 „ Cholesterylacetatsol	++	++	+	—	—	—	—	—
4. + 5 „ Cholesterylbenzoatsol	+	—	—	—	—	—	—	—
5. + 5 „ Cholesterylpalmitatsol	—	—	—	—	—	—	—	—

Die Ablesung der Werte erfolgte nach 90 Minuten; die Konzentration der Sole war ½ millimolar. — Die Grenzwerte sind sehr scharf: Während z. B. bei Cholesterylbenzoatsol nach Zusatz von 0,5 ccm m/2 KCl ein schöner Tyndallkegel und zahlreiche, lebhaft bewegte Ultramikronen zu sehen sind, tritt nach Zusatz von 0,6 ccm m/2 KCl

kein Tyndalleffekt mehr auf, und im Ultramikroskop sind nur noch grobe Konglomerate zu erkennen. Nur das Cholesterylpalmitatsol verhält sich anders; bei ihm sind die Übergänge fließend, so daß ultramikroskopisch noch ein Tyndallkegel und zahlreiche Ultramikronen sichtbar sind, wenn makroskopisch schon lange eine Trübung des Sols besteht.

Wie die Messungen der Kapillaraktivität zeigen, sind Cholesterin und seine niedrigen Ester stärker oberflächenaktiv als die hochwertigen. Infolgedessen werden die ersteren stärker adsorbiert und laden negative Kolloide stärker negativ auf als die letzteren, so daß sie auf Grund ihrer Ladung stabilisierend wirken müßten. Wie die oben mitgeteilten Versuche aber zeigen, verhalten sie sich umgekehrt: Die niedrigen Ester wirken stärker sensibilisierend als die hochwertigen. Es müssen also andere Kräfte als elektrische den Stabilitätszustand der Kolloide bestimmend beeinflussen.

Nach theoretischen Überlegungen wäre zu erwarten, daß die Affinität der Cholesterinester zu Wasser mit zunehmender Kohlenstoffkette — entsprechend dem Verhalten der freien Fettsäuren — abnimmt. Wie die Bestimmung ihrer Fällungswerte indes ergibt, besitzen die niedrigen Cholesterinester einen kleineren Fällungswert, also eine geringere Affinität zu Wasser und eine geringere Hydratation als die hochwertigen. Diese hydrophobe Eigenschaft teilen die niedrigen Cholesterinester ebenso wie das freie Cholesterin den Kolloiden mit, an die sie adsorbiert sind, und wirken dadurch auf letztere sensibilisierend. Die hochwertigen Ester des Cholesterins dagegen, die mehr hydrophil und daher stärker hydratisiert sind, wirken durch ihre größere Wasseraffinität stabilisierend, so daß also *die homologe Reihe der Fettsäureester des Cholesterins mit zunehmender Kohlenstoffkette einen zunehmenden Fällungswert besitzt und abnehmend stark sensibilisierend wirkt.*

Wenn man berücksichtigt, daß die verwendeten Lösungen nur zweifach millimolare Konzentration besitzen, so ergibt sich daraus, daß die Sole eine recht starke Oberflächenaktivität zeigen und daß frühere Untersuchungen mit offenbar unbrauchbaren Cholesterinsuspensionen ausgeführt wurden, da sich in der Literatur wiederholt die Angabe findet, daß Cholesterin die Oberflächenspannung des Wassers nicht erniedrigt (9).

IV.

Von Untersuchungen *Brinkmans* (10) ausgehend, äußert *Kürten* (11) die Anschauung, daß das Cholesterin als Anelektrolyt eine elektrische Isolation der Zelle und damit Ladungsverminderung zu bewirken vermag; das Lecithin dagegen könne schon in geringen Spuren aufladend wirken. Eigene Versuche zeigten indes, daß das Cholesterinsol im

Kataphoreseapparat zur Anode wandert, eine Beobachtung, die auch andere Untersucher (12) gemacht haben und die mit der Angabe von *Porges* und *Neubauer* (13) in Übereinstimmung steht, daß elektropositive Kolloide und Säuren mit Cholesterin und Lecithin Fällungen geben. Das Cholesterin gehört demnach zu den typischen Suspensionskolloiden, die eine ausgesprochene elektrische Ladung besitzen.

Im *Hittorf*schen Überführungsapparat angestellte Versuche zeigten ferner, daß das Cholesterin in n/100 Pufferlösungen von variierendem p_H auch bei $p_H = 1{,}3$ noch nicht umgeladen wird. Da ferner der isoelektrische Punkt des Lecithins bei $p_H = 4{,}5$ liegt, so ist das Lecithin ebenso wie das Cholesterin bei der Reaktion des Blutes negativ geladen; es ist also kein Grund erkennbar, wie ein Antagonismus zwischen Cholesterin auf Grund einer entladenden und Lecithin auf Grund einer aufladenden Wirkung zustande kommen soll. Für die Ansicht, daß ein Antagonismus zwischen Lecithin und Cholesterin auf Grund elektrischer Eigenschaften nicht bestehen kann, sprechen nicht nur die oben mitgeteilten Versuche, sondern auch die von *Heesch* (14), der fand, daß tierische Zellen durch Lecithin und Cholesterin in gleicher Richtung für die Umladung durch Lanthansalze sensibilisiert werden.

Aus der Dielektrizitätskonstante auf entladene Wirkungen gerade des Cholesterins zu schließen, ist ebenfalls nicht angängig, denn die D. K. des Lecithins ist nicht nennenswert anders als die des Cholesterins, so daß man bei Berücksichtigung der D. K. eher geneigt wäre zu glauben, daß die beiden Stoffe gleichartig wirken. Deshalb muß die Annahme *Kürtens* als nicht bewiesen bezeichnet werden, daß mit einer durch Cholesterin bedingten Ladungsverminderung der Zellen, die der Ausdruck einer dem Lecithin antagonistisch wirkenden Kraft ist, eine Behinderung der Ionenbewegung einhergehe, die in ursächlichem Zusammenhang mit der Hydropsbildung stehe, zumal auch *Pulay* (15) keine Beziehungen zwischen Cholesterin- und Wassergehalt der roten Blutkörperchen fand, also einen Zusammenhang zwischen Cholesterin und Quellungszustand der Erythrocyten nicht feststellen konnte.

V.

Es ist oben gezeigt worden, daß sich die Ester des Cholesterins negativ geladenen Kolloiden gegenüber anders verhalten als freies Cholesterin. Dieser Befund kann einen Fingerzeig für die Deutung der von vielen Autoren festgestellten Eigentümlichkeit geben, daß das freie Cholesterin und seine Ester im Organismus in einem bestimmten Verhältnis zueinander gehalten werden. Diese Tatsache ist sicher von Wichtigkeit für die Erhaltung des normalen physikalischen Zustandes der übrigen Biokolloide und hat nicht allein die Bedeutung einer Entgiftungsvorrichtung. Finden Entgiftungen durch Bindung

an freies Cholesterin statt, wie es von der Entgiftung des Saponins durch Cholesterin bekannt ist, so können sie unter Umständen den normalen physikalischen Zustand der Zellkolloide stören, wenn das entstehende Produkt die Eigenschaften der Cholesterinester besitzt. Von diesem Gesichtspunkt aus gewinnt auch die alte Beobachtung eine besondere Bedeutung, daß eine Cholesterinvermehrung im Organismus stets eine Zunahme der fettsäurehaltigen Phosphatide zur Folge hat.

Zusammenfassung.

1. Cholesterin und Lecithin zeigen in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften weitgehend analoge Wirkungen.

2. Sowohl Cholesterin als auch Lecithin wirken sensibilisierend auf negative Kolloide.

3. Die homologe Reihe der Fettsäureester des Cholesterins sensibilisiert negative Kolloide mit zunehmender Kohlenstoffkette abnehmend stark.

4. Cholesterin erniedrigt stark die Oberflächenspannung des Wassers, desgleichen seine Fettsäureester, deren Oberflächenaktivität mit zunehmender Kohlenstoffkette abnimmt.

5. Der Fällungswert des Cholesterins und seiner Fettsäureester steigt mit zunehmender Kohlenstoffkette an.

6. Die Konstanz der Proportionalität zwischen freiem Cholesterin und Cholesterinestern — besonders den hochwertigen — ist von Wichtigkeit für den physikalischen Zustand der Körperkolloide.

Literatur.

1) *B. Stuber*, diese Zeitschr. **58**, 493, 1913. — 2) *I. Bang*, ebendaselbst **90**, 383, 1918. — 3) *Bloor* und *Knudson*, Journ. of biol. Chem. **29**, 7, 1917. — 4) *F. Kauders*, diese Zeitschr. **55**, 99, 1913. — 5) *A. Windaus*, Biochem. Handlexikon **8**, 268, 1911; *A. Fodor*, ebendaselbst 8, 473, 1914; *O. Dalmar*, ebendaselbst **10**, 156, 1923. — 6) *P. v. Weimarn*, Journ. russ. phy.-chem. Ges. **48**, 1477, 1911. — 7) *P. Gaubert*, C. r. de l'acad. des sciences **154**, 995, 1912; **156**, 149, 1913; **157**, 1446, 1913; **162**, 764, 1916. — 8) *G. Friedel*, Ann. de physique 18, Nov.-Dez.-Heft 1922; referiert nach *Zocher*, Ronas Ber. **27**, 2, 1924. — 9) *L. Berczeller*, diese Zeitschr. **66**, 218, 1914; **84**, 71, 1917. — 10) *R. Brinkman* und *E. van Dam*, ebendaselbst **108**, 52, 1920. — 11) *H. Kürten*, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 27, S. 1217. — 13) *H. Bechhold*, Die Kolloide in Biologie und Medizin, 4. Aufl. — 13) *O. Porges* und *E. Neubauer*, diese Zeitschr. 7, 152, 1908. — 14) *E. Heesch*, Pflügers Arch. **190**, 198, 1921. — 15) *E. Pulay*, Dermatol. Wochenschr. **76**, 333, 1923.

Zum Problem des Diabetes.

Von

F. M. Bricker.

[Aus dem Laboratorium für pathologische Physiologie des medizinischen Instituts in Charkow (Rußland).]

(Eingegangen am 5. November 1924.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die Frage nach dem Zusammenhang des Kohlenhydratstoffwechsels mit der Reaktion des Blutes entstand in der letzten Zeit auf Grund des Streites über die Adrenalinhyperglykämie.

Fast alle Forscher fanden nach der Einverleibung von Adrenalin eine Reaktionsänderung des Blutes mit deutlicher Neigung zur Acidosis (*Peters* und *Gleylin*, *Tatum*, *Elias* und *Sammartino*, *Moraczewski* und *Lindner* u. a.). Es entwickelte sich jedoch nunmehr ein heißer Kampf — unter Heranziehung zahlreicher experimenteller und klinischer Beobachtungen — um die Entscheidung folgender Frage: Tritt die Acidosis oder die Hyperglykämie früher auf? Was ist die Ursache, was die Folge? *Peters* und *Gleylin* behaupten, daß die Acidose das ursächliche Moment wäre. *Tatum* dagegen geht zur Begründung seiner gegenteiligen Ansicht von folgenden Tatsachen aus: 1. Die Einführung großer Zuckermengen in das Blut rufen, wie die Arbeiten von *Mc Lead* und *Falk* zeigen, an und für sich schon eine erhöhte Konzentration der H-Ionen hervor. 2. Nach vorangehender Verminderung der Alkalireserve mittels Phlorhidzin konnte eine Adrenalin-Hyperglykämie ohne Reaktionsänderung des Blutes beobachtet werden. 3. Adrenalininjektion nach vorangehender Einführung von Salzsäure oder sauren (primären) Phosphaten in den Magen rief gleichfalls eine Hyperglykämie ohne Änderung der Alkalireserve hervor. In einer anderen Arbeit zeigte dieser Autor zusammen mit *Aktinson*, daß in bezug auf Acidose stärker wirksame Stoffe sich nicht entsprechend aktiv erweisen hinsichtlich ihrer hyperglykämischen Wirkung[1]).

Schließlich gibt es noch Vertreter einer dritten Ansicht (*Elias* und *Sammartino*), derzufolge sowohl die Acidose als auch die Hyperglykämie

[1]) CO_2 vermindert die Alkalireservekapazität von 0,79 auf 0,37 ccm. der Zuckergehalt des Blutes steigt von 0,13 auf 0,32 Proz.; Cyanid vermindert die Alkalireservekapazität von 0,60 auf 0,28 ccm, der Zuckergehalt des Blutes steigt von 0,136 auf 0,23 Proz.

(durch Adrenalinwirkung entstanden) eher als voneinander unabhängige, koordinierte Erscheinungen aufzufassen sind, die sich als Resultat einer Reizung des sympathischen Nervensystems einstellen.

Ohne diese Auffassungen einer kritischen Betrachtung unterziehen zu wollen, sind wir der Meinung, daß diese Frage entschieden werden muß zusammen mit dem allgemeinen Problem der Beziehungen zwischen Kohlehydratstoffwechsel und Reaktion des Nährmediums. Erst nach Beantwortung dieser Hauptfrage ist es möglich, bei den Teilerscheinungen zu verweilen, und da die Bedingungen, die eine Hyperglykämie hervorrufen können, mannigfaltig sind, so kann man annehmen, daß das Wesen dieser Erscheinung überall das gleiche ist, verschieden nur die Wege ihres Zustandekommens.

Heute schon liegen viele interessante und wichtige Tatsachen vor, die unsere Aufgabe erleichtern und es gestatten, unmittelbar an die Lösung des von uns berührten Problems heranzugehen. So zeigten *Pollak* und *Fröhlich*, und früher schon *Kretschmer*, daß bei Durchleitung von Adrenalin durch eine isolierte Leber eine Vermehrung der Zuckerausscheidung statthat, eine Erscheinung, die um so deutlicher auftritt, wenn zur durchgeleiteten Flüssigkeit etwas Säure hinzugefügt wird. Zusatz von Alkali hemmt die zuckermobilisierende Wirkung des Adrenalins, wobei der Verdacht, das Adrenalin könnte im alkalischen Medium zerstört werden, vollkommen fortfällt, da Hinzufügung von Säure bis zur neutralen Reaktion die Aktivität des Adrenalins wiederum herstellt. *Underhill* gelang es, mittels Soda die Adrenalinhyperglykämie zu verzögern. Dies bestätigten in letzter Zeit auch *György* und *Herzberg*, die ihre Beobachtungen an Kindern (von ½ bis 7 Jahren) durchführten. Sie zeigten, daß doppeltkohlensaures Natron den glykämischen Effekt des Adrenalins in hohem Maße verzögert, während Chlorammonium die entgegengesetzte Wirkung zeigt. Letztere Erscheinung wird damit erklärt, daß das Ammonium im Organismus in Harnstoff übergeführt wird, während das Chlorion in dissoziiertem Zustande bestehen bleibt und so eine Erhöhung von C_H bedingt. Ebenso vermochten *Gottschalk* und *Pohle* das Auftreten einer Adrenalinglykämie mittels Soda zu verhindern, nur *Beumer* hält auf Grund seiner Beobachtungen an Kindern an einer anscheinend entgegengesetzten Ansicht fest.

Besonderes Interesse verdienen die Untersuchungen über Adrenalinwirkung auf tetanische Tiere. Die Tetanie stellt nämlich einen solchen Zustand des Organismus vor, bei dem Alkalase beobachtet wird und infolgedessen keine Adrenalinglykämie erwartet werden sollte. Dies wurde auch glänzend bestätigt durch die Untersuchungen von *Petenyi* und *Lax*, *Beumer* und *Schäfer*. Sie zeigten, daß bei Tetanie von Säuglingen und Erwachsenen Adrenalin eine sehr unbedeutende Hyperglykämie hervorruft, die mitunter überhaupt ausbleiben kann. Schon aus den angeführten Tatsachen allein drängt sich die Frage auf: Spielt die Alkaleszenz hier eine selbständige Rolle durch Einwirkung auf den Chemismus der Zelle, oder stellt die Alkaleszenz eine an sich ungünstige Bedingung für die Adrenalinwirkung dar?

Was den letzten Teil der Frage betrifft, so scheint diese Vermutung erwiesen zu sein auf Grund der erwähnten Arbeiten und Beobachtungen von *Snyder* und *Martin* und *Mc Carison*.

Über den ersten Teil der Frage gibt es auch bereits interessante Arbeiten. Schon im vergangenen Jahrhundert wurde gezeigt, daß die Einführung von Mineral- (*Naunyn*, *Frerichs*, *Pavy*, *Külz*) und organischen Säuren (*Golz*, *Külz*) bei Tieren Glykosurie hervorruft. Besonders bemerkenswert erschien

die von *P. Ehrlich* gemachte Beobachtung, daß bei Fröschen Glykogen nach dem Einbringen in eine angesäuerte Zuckerlösung zerfällt, in alkalischer Lösung aber aufgebaut wird.

Elias, der Tieren bloß Zucker einverleibte, fand ihn nicht im Urin ausgeschieden und konnte Glykogenspeicherung in der Leber beobachten. Sowie er aber zugleich mit dem Zucker Säure in den Magen einführte, konnte er Hyperglykämie, Glykosurie und Verminderung des Glykogengehalts in der Leber beobachten. Diese Versuche wurden später mit gleichem Erfolge von *Torres-Umaña* wiederholt.

I.

Im ersten Teil unserer Untersuchungen suchten wir den Einfluß der intravenösen Injektion von Säuren und Alkali auf den Zuckergehalt des Blutes aufzuklären. Die Lösungen wurden Kaninchen in die Randvene des Ohres eingeführt. Die Blutzuckerbestimmung erfolgte nach *Bang*. Die Norm des Blutzuckergehalts der Versuchstiere wurde unmittelbar vor der intravenösen Injektion der zu untersuchenden Lösungen von Säuren oder Alkali festgestellt. Als Alkali verwendeten wir reinstes, doppeltkohlensaures Natron ($NaHCO_3$) von *Merck*. Bei der Wahl der Säure entschieden wir uns für Milchsäure, da bei hyperglykämischer Acidose gerade diese Säure von den Autoren reichlich angetroffen wurde.

1. Serie.

Versuch 1.
Gewicht des Kaninchens 1502 g.

Norm	Zeit vom Augenblick der Injektion		
	n. $3^1/_2$ Min.	nach 10 Min.	nach 32 Min.
Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
0,117	0,141	0,160	0,132

Injiziert wurde 1 ccm 2 proz. Lösung von Milchsäure.

Versuch 2.
Gewicht des Kaninchens 1490 g.

Norm	Zeit vom Augenblick der Injektion		
	nach 4 Min.	nach 11 Min.	nach 32 Min.
Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
0,149	0,198	0,170	0,170

Injiziert wurden $1^1/_2$ ccm 2 proz. Lösung von Milchsäure.

Versuch 3.
Gewicht des Kaninchens 1345 g.

Norm	Zeit vom Augenblick der Injektion		
	nach 3 Min.	nach 11 Min.	nach 33 Min.
Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
0,148	0,149	0,161	0,155

Injiziert wurden 2 ccm 2 proz. Lösung von Milchsäure.

2. Serie.

Versuch 4.
Gewicht des Kaninchens 1580 g.

Norm	Zeit vom Augenblick der Injektion		
Proz.	nach 5 Min. Proz.	nach 15 Min. Proz.	nach 60 Min. Proz.
0,08	0,028	0,08	0,07

Injiziert wurden 5 ccm 5 proz. Lösung von doppeltkohlensaurem Natron.

Versuch 5.
Gewicht des Kaninchens 1440 g.

Norm	Zeit vom Augenblick der Injektion		
Proz.	nach 9 Min. Proz.	nach 14 Min. Proz.	nach 65 Min. Proz.
0,06	0,046	0,06	0,057

Injiziert wurden 5 ccm 5 proz. Lösung von doppeltkohlensaurem Natron.

Versuch 6.
Gewicht des Kaninchens 1610 g.

Norm	Zeit vom Augenblick der Injektion		
Proz.	nach 3 Min. Proz.	nach 6 Min. Proz.	nach 20 Min. Proz.
0,122	0,058	0,103	0,100

Injiziert wurden 5 ccm 7 proz. Lösung von doppeltkohlensaurem Natron.

Versuch 7.
Gewicht des Kaninchens 1565 g.

Norm	Zeit vom Augenblick der Injektion	
Proz.	nach 3 Min. Proz.	nach 6 Min. Proz.
0,08	0,063	0,05

Injiziert wurden 5 ccm 7 proz. Lösung von doppeltkohlensaurem Natron.

Aus den Versuchen 1, 2 und 3 geht hervor, daß eine Reaktionsänderung des Blutes nach der sauren Seite hin zweifellos zu einer Anreicherung von Zucker führt. Der Zuckergehalt erhöht sich nach unseren Untersuchungen auf 9 Proz. (Versuch 3) bis 36,7 Proz. (Versuch 1). Diese Hyperglykämie ist eine vorübergehende, denn der normale Organismus ist imstande, das durch plötzliche Störung von außen veränderte Gleichgewicht der H- und OH-Ionen rasch wieder herzustellen.

Nicht weniger lehrreich sind die Versuche 4 bis 7. Hier beobachten wir, daß das eingeführte Alkali ohne jeden Zweifel eine Verarmung des Blutes an Zucker hervorruft, in diesen Fällen mehr (65 Proz., Versuch 4), in anderen weniger (21 Proz., Versuch 7).

Daraus kann man schließen, daß die Menge des Blutzuckers sicher eng zusammenhängt mit dem p_H des Blutes. Auf Grund dieser Tatsache läßt sich a priori folgende Regel aufstellen: *Bei demjenigen Zustande des Organismus, bei dem die C_H seines Blutes erhöht ist, ist unbedingt eine Hyperglykämie zu erwarten, dort, wo die C_H erniedrigt ist (Alkalose), wird eine Hypoglykämie zu erwarten sein.* Bei tetanischen Tieren (nach Entfernung der Nebenschilddrüse oder Vergiftung mit Guanidin oder bei Atmungstetanie), bei denen das p_H des Blutes erhöht ist (Alkalose), kommt eine Hypoglykämie zur Beobachtung (*Underhill*, *Underhill* and *Blaterwick*, *György* und *Vollmer*, *Watanabe*). Auch bei der Tetanie von Kindern wurde eine Hypoglykämie festgestellt (*Petenyi* und *Lax*).

Wie ist nun der Mechanismus der Wirkung der Acidose bzw. Alkalose auf den Zuckergehalt des Blutes? Der Gedankengang des Untersuchers war, ein Sekret zu suchen, selbstverständlich in der Leber, in der ja nach unseren Begriffen die Synthese und der Zerfall des Glykogens stattfindet[1]).

Außerordentlich bemerkenswert sind die Versuche von *Elias*. Er ließ isolierte Schildkrötenleber mit Zuckerlösungen von verschiedener Reaktion durchströmen. Sorgfältige Untersuchungen zeigten, daß bei saurer Reaktion die Leber an Glykogen verarmte, bei alkalischer Reaktion aber sich an Glykogen bereicherte. Nicht weniger wertvoll sind die Versuche *Lessers*, der beim Durchströmen überlebender Lebern mit einer Lösung von $C_H = 1{,}2 \,.\, 10^{-7}$ feststellte, daß sich der Zucker in der ausströmenden Flüssigkeit um 35 Proz. vermehrte. Bei Erhöhung des Säuregrades der durchströmenden Flüssigkeit bis $C_H = 3{,}5 \,.\, 10^{-7}$ konnte er eine Erhöhung der Zuckerausscheidung bis auf 85 Proz. dartun.

Diese Versuche finden bis zu einem gewissen Grade eine Erklärung in der Arbeit von *Langfeldt*, welcher zeigte, daß das Optimum der Diastasewirkung der Leber bei $p_H = 6{,}8$ zu finden sei.

Damit erscheint es verständlich, warum es unter anderem auch *Gottschalk* und *Pohle* gelang, das Auftreten der Adrenalinglykämie, bei der lokale Acidose der Leber gefunden wurde, zu verhindern, wenn vorher Soda hinzugesetzt worden war. Nach ihren Versuchen ist die Adrenalinhyperglykämie folgerichtig eine hepatogene Hyperglykämie. Ist dies aber richtig hinsichtlich des adrenalen Diabetes, welcher nicht auftritt, wenn die Leber aus dem allgemeinen Kreislauf ausgeschaltet wird (durch eine *Ekk*sche Fistel), wie dies *Michaud* zeigte, so bleibt das Verschwinden des Glykogens aus den Muskeln bei den anderen Formen der Glykämie vollkommen unverständlich. Welcher Mechanismus liegt nun dieser Erscheinung zugrunde? Zur Beantwortung dieser Frage stellten wir eine Reihe von Versuchen an.

II.

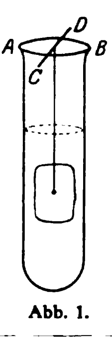


Abb. 1.

In eine Reihe von Probiergläschen wird eine auf 38° C erwärmte *Locke*sche Lösung eingefüllt. In diese werden Stückchen verschiedener Gewebe eines durch die Art. carotis frisch entbluteten Kaninchens versenkt. Die Stückchen sind mittels eines Fadens an einem über die Öffnung des Probiergläschens gelegten Holzstäbchen befestigt, dessen Länge CD größer ist als der Durchmesser AB des Probiergläschens (Abb. 1). Das Gewebsstückchen soll die Wand des Gläschens nicht berühren. Das Volumen der Gewebsstückchen verhielt

[1]) Es gibt Hinweise darauf, daß auch die Muskeln diese Fähigkeit besitzen (*Bollmann*, *Magath* und *Mann*).

sich in unseren Versuchen zum Volumen der Flüssigkeit wie 1 : 3. Die Reaktionsänderung der *Locke*schen Flüssigkeit erreichten wir durch Hinzufügung reinster *Merck*scher Präparate von Milchsäure oder doppeltkohlensauren Natrons. Die Probiergläschen mit den Gewebsstückchen stellten wir dann auf 2 bis 2½ Stunden in den Thermostaten (t — 39°). Vor Einbringung in den Thermostaten und unmittelbar nach der Herausnahme wurde p_H und der Zuckergehalt der Lösung in Prozenten festgestellt. Die Bestimmung von p_H erfolgte nach der Indikatorenmethode von *Michaelis*, die des Zuckers nach *Bangs* Mikromethode. Die Gewebsstückchen wurden vor dem Einbringen in die *Locke*sche Flüssigkeit mit verschiedenem C_H in warmer (38°) physiologischer Kochsalzlösung (0,9 Proz.) gewaschen. Zu Beginn des Versuchs wurde die *Locke*sche Flüssigkeit mit Sauerstoff gesättigt.

Versuch 8 mit Kaninchenleber.

	p_H	Zucker Proz.	p_H	Zucker Proz.	p_H	Zucker Proz.
Vor Einbringung des Probiergläschens in den Thermostaten	7,2	0,15	5,5	0,15	8,1	0,15
Nach 2½ stündigem Verweilen im Thermostaten	7,2	0,15	6,0	0,156	7,0	0,03
Versuch 9 mit Kaninchenleber.						
Vor Einbringung des Probiergläschens in den Thermostaten	7,2	0,125	6,4	0,125	8,0	0,125
Nach 2 stündigem Verweilen im Thermostaten	7,2	0,12	7,0	0,196	7,6	0,038
Versuch 10 mit Kaninchenmuskel.						
Vor Einbringung des Probiergläschens in den Thermostaten	7,2	0,15	5,5	0,15	8,1	0,15
Nach 2½ stündigem Verweilen im Thermostaten	7,2	0,135	6,2	0,24	7,2	0,13
Versuch 11 mit Kaninchenmuskel.						
Vor Einbringung des Probiergläschens in den Thermostaten	7,2	0,125	6,4	0,125	8,0	0,125
Nach 2 stündigem Verweilen im Thermostaten	7,2	0,125	6,8	0,144	7,4	0,102

Versuch 12 mit Kaninchenniere.

	p_H	Zucker Proz.	p_H	Zucker Proz.	p_H	Zucker Proz.
Vor Einbringung des Probiergläschens in den Thermostaten	7,2	0,15	5,5	0,15	8,1	0,15
Nach 2½ stündigem Verweilen im Thermostaten	7,2	0,147	6,2	0,206	7,2	0,133

Hinsichtlich der Leber läßt sich hier eine vollständige Übereinstimmung mit den Versuchen von *Elias* und *Lesser* (s. oben) an der ganzen isolierten Leber erkennen. Im übrigen zeigen diese Versuche, daß *nicht bloß Lebergewebe, sondern auch jedes andere in gleicher Weise je nach dem Medium im Sinne einer Assimilation bzw. Dissimilation der Glykose reagiert.*

Wir kamen also schließlich dahin, um mit vollem Recht ein und dieselben Erscheinungen durch ein für alle lebenden Gewebe allgemein gültiges Gesetz zu vereinigen. Wir können dieses Gesetz einstweilen nur konstatieren, in seinem Wesen aber noch nicht ergründen. Wenn man hinsichtlich der Leber von einem Optimum der Bedingungen für Diastasewirkung sprechen kann, so gibt es hinsichtlich der Muskeln und anderen Gewebsarten noch keine Hinweise dafür. Wir stehen daher vor einer Alternative: Entweder ist die Ursache dieser Erscheinungen in fermentativen Prozessen zu suchen, oder aber es führt eine Veränderung der p_H, die eine Abdissoziation von OH- bzw. H-Ionen zur Folge hat, nicht bloß zu einem Wechsel in der Verteilung der Kationen, sondern auch der Grad und die Art des Dispersionsmittels des Gewebes, der Absorptionseigenschaften der Kolloide des Gewebes wird hinsichtlich der Glykose verändert. Im folgenden versuchen wir, an diese Frage wenigstens in einigen Details näher heranzutreten.

III.

In dieser Serie wurden die Versuche an den hinteren Extremitäten von Kaninchen angestellt, d. h. an einem Konglomerat einiger Gewebe. Durch Durchschneidung der Art. carotis wird das Kaninchen entblutet. Wenn der Blutstrahl stark abgenommen hat und die Krämpfe des Tieres schon zu Ende gekommen sind, wird mit raschem Schnitt die Bauchhöhle geöffnet, die Aorta freigelegt und in dieselbe unterhalb des Abgangs der Nierenarterien in der Richtung nach den Hinterbeinen eine Kanüle eingebunden. Hierauf wird die Kanüle mit einem Apparat verbunden, wie wir ihn a. a. O. beschrieben haben[1]). Durch Öffnen des Hahnes lassen wir durch die Kanüle angesäuerte *Locke*sche Lösung einfließen. Gleich darauf binden wir eine zweite Kanüle in die Vena cava inf. ein. Durch Durchschneidung des Rectums und Unterbindung der entsprechenden Gefäße schalten wir den Darmtrakt von der Durchspülung aus. Schließlich werden in der Höhe der eingeführten Kanülen alle Weichteile und die Wirbelsäule durchschnitten und alles, was sich außerhalb der von der Nährflüssigkeit durchspülten Sphäre befindet, entfernt. Auf diese Weise läuft die Flüssigkeit durch die Aorta, durch sämtliche Gewebe der hinteren Extremitäten und

[1]) Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 42, 434.

fließt durch die untere Hohlvene aus, d. h. sie vollführt einen natürlichen Kreislauf. Die Nährflüssigkeit tritt in die Aorta mit einer Temperatur von 38 bis 39° ein. Durch Hinzufügen von Soda oder Milchsäure zur *Locke*schen Flüssigkeit änderten wir die Konzentration der Wasserstoffionen, die wir mittels der Indikatorenmethode von *Michaelis* ermittelten. Ziel dieser Versuche war, festzustellen, welche quantitative Änderungen hinsichtlich des Zuckergehalts der die Gewebe durchströmenden Flüssigkeit bei diesem oder jenem p_H dieser Flüssigkeit vor sich gingen. Die Zuckerbestimmung erfolgte nach *Bang*.

Versuch 13.

Hintere Extremitäten eines Kaninchens (1518 g).

Protokoll:

Von 11 Uhr 10 Minuten bis 12 Uhr 20 Minuten wird normale *Locke*sche Lösung ($p_H = 7,4$) durchströmen gelassen.

Von 12 Uhr 20 Minuten bis 12 Uhr 48 Minuten wird *Locke*sche Lösung ($p_H = 6,3$) durchströmen gelassen.

Von 12 Uhr 48 Minuten bis 1 Uhr 14 Minuten wird normale *Locke*sche Lösung ($p_H = 7,4$) durchströmen gelassen.

Von 1 Uhr 14 Minuten wird *Locke*sche Lösung ($p_H = 8,0$) durchströmen gelassen.

a		b		c		d		e	
p_H	Zucker Proz.	p_H	Zucker Proz.	p_H	Zucker Proz.	p_H	Zucker Proz.	p_H	Zucker Proz.
7,4	0,12	6,3	0,12	7,4	0,12	8,0	0,12	8,0	0,12
7,4	0,12	6,6	0,13	6,9	0,16	7,4	0,155	7,6	0,098
12h5'—12h19·		12h25'-12h47'		12h56'—1h13'		1h15'—1h26'		1h26'—1h36'	

Bemerkung I: Die oberen Zahlenreihen der einzelnen Tabellen beziehen sich auf die einströmende Flüssigkeit, die unteren auf die ausströmende.

Bemerkung II: Unter jeder Tabelle ist der Zeitraum vermerkt, im Verlaufe dessen die auslaufende Flüssigkeit zur Bestimmung von p_H und des Zuckergehalts aufgefangen wurde.

Versuch 14[1]).

Hintere Extremitäten eines Kaninchens (1692 g).

Protokoll:

Von 11 Uhr 25 Minuten bis 12 Uhr 28 Minuten wird normale *Locke*sche Flüssigkeit ($p_H = 7,4$) durchströmen gelassen.

Von 12 Uhr 28 Minuten bis 12 Uhr 52 Minuten wird alkalische *Locke*sche Flüssigkeit ($p_H = 8,1$) durchströmen gelassen.

Von 12 Uhr 52 Minuten bis 1 Uhr 20 Minuten wird normale *Locke*sche Flüssigkeit ($p_H = 7,4$) durchströmen gelassen.

Von 1 Uhr 20 Minuten bis 1 Uhr 42 Minuten wird saure *Locke*sche Flüssigkeit ($p_H = 5,6$) durchströmen gelassen.

Von 1 Uhr 42 Minuten wird normale *Locke*sche Flüssigkeit ($p_H = 7,4$) durchströmen gelassen.

---

[1]) Siehe Bemerkungen zu Versuch 13.

a

p_H	Zucker Proz.
7,4	0,15
7,4	0,196

12h16'-12h28'

b

p_H	Zucker Proz.
8,1	0,15
7,6	0,165

12h31'-12h49'

c

p_H	Zucker Proz.
7,4	0,15
7,5	0,111

12h55'—1h15'

d

p_H	Zucker Proz.
5,6	0,15
7,0	0,132

1h25'—1h42'

e

p_H	Zucker Proz.
7,4	0,15
7,3	0,159

1h44'—2h

Versuch 15[1]).

Hintere Extremitäten eines Kaninchens (1480 g).

Protokoll:

Von 11 Uhr 50 Minuten bis 12 Uhr 48 Minuten wird normale *Locke*sche Flüssigkeit (p_H = 7,4) durchströmen gelassen.

Von 12 Uhr 48 Minuten bis 1 Uhr 36 Minuten wird saure *Locke*sche Flüssigkeit (p_H = 5,6) durchströmen gelassen.

Von 1 Uhr 36 Minuten bis 1 Uhr 56 Minuten wird normale *Locke*sche Flüssigkeit (p_H = 7,4) durchströmen gelassen.

Von 1 Uhr 56 Minuten bis 2 Uhr 35 Minuten wird alkalische *Locke*sche Flüssigkeit (p_H = 8,1) durchströmen gelassen.

Von 2 Uhr 35 Minuten wird normale *Locke*sche Flüssigkeit (p_H = 7,4) durchströmen gelassen.

a

p_H	Zucker Proz.
7,4	0,097
7,2	0,09

12h35'—12h47'

b

p_H	Zucker Proz.
5,6	0,097
6,6	0,098

12h48'—1h2'

c

p_H	Zucker Proz.
5,6	0,097
6,6	0,093

1h2'—1h16'

d

p_H	Zucker Proz.
5,6	0,097
6,4	0,131

1h25'—1h36'

e

p_H	Zucker Proz.
7,4	0,097
6,9	0,099

1h38'—1h56'

f

p_H	Zucker Proz.
8,1	0,097
7,6	0,1

1h58'—2h22'

g

p_H	Zucker Proz.
8,1	0,097
7,7	0,082

2h22'—2h35'

h

p_H	Zucker Proz.
7,4	0,097
7,4	0,093

2h37'—3h5'

Zur Prüfung der erhaltenen Resultate übergehend, verweilen wir ganz von selbst bei einigen auf den ersten Blick sonderbaren Erscheinungen. Im Versuch 13 sehen wir, daß beim Durchleiten saurer (p_H = 6,3) *Locke*scher Flüssigkeit die Menge des Zuckers in der ausströmenden Flüssigkeit fast unverändert bleibt und erst nach Durchspülung der Extremitäten mit normaler *Locke*scher Lösung (p_H = 7,4) die Durchspülungsflüssigkeit an Glucose angereichert wird. Diese vermehrte Ausscheidung von Glucose wird auch im ersten Augenblick (*d*) des Durchgangs von alkalischer *Locke*scher Flüssigkeit (p_H = 8,0) durch die Gewebe beobachtet, und erst später (*e*) tritt ein Verbrauch der Glucose auf.

[1]) Siehe Bemerkungen zu Versuch 13.

Versuch 14 stellt ein ähnliches Bild dar. Beim Durchleiten alkalischer *Locke*scher Flüssigkeit kommt es zu vermehrter Glykoseausscheidung, die bei nachfolgender Durchspülung mit normaler *Locke*scher Lösung ins Gegenteil umschlägt. Der Verbrauch der Glykose seitens der Gewebe hält auch beim Durchleiten saurer *Locke*scher Flüssigkeit an. Bei Durchspülung mit normaler *Locke*scher Lösung bemerken wir jedoch schon eine Vermehrung der Glucoseausscheidung.

Auf diese Weise stehen wir vor Tatsachen, die durch ihre Objektivität unsere bisher gemachten Beobachtungen nicht nur nicht bekräftigen, sondern sich anscheinend in schroffen Gegensatz zu ihnen stellen. Und in der Tat, leiten wir Alkali hindurch, so finden wir in der ausströmenden Flüssigkeit mehr Glykose als in der einströmenden, leiten wir Säure ein, so finden wir in der ausströmenden Flüssigkeit weniger Glykose als in der einströmenden. Erst beim darauffolgenden Durchspülen mit normaler *Locke*scher Flüssigkeit erhalten wir das, was wir beim Durchströmen der Untersuchungsflüssigkeit zu erhalten gedachten. Zur Erklärung dieser paradoxen Erscheinung bietet sich wie von selbst die Beobachtung dar, die in *Krawkows* Laboratorium gemacht wurde — die Wirkung eines Giftes im Moment seiner Ausscheidung. Aber diese Erklärung kann uns natürlich nicht befriedigen wegen der Unklarheit bei ihrer Anwendung an den von uns beschriebenen Erscheinungen.

Wenn wir nochmals unsere Aufmerksamkeit auf die Versuchsprotokolle zurückwenden, so sehen wir folgendes. Die einströmende Flüssigkeit (Versuch 13b) besitzt $p_H = 6{,}3$, die ausströmende $p_H = 6{,}6$. Man könnte auf Grund dessen glauben, daß die Lebenstätigkeit des isolierten Gewebes begleitet wird von einer Alkaliausscheidung. Aber gleich darauf (Versuch 13d), beim Durchleiten alkalischer Flüssigkeit ($p_H = 8{,}0$), hat die ausströmende Flüssigkeit eine mehr saure Reaktion ($p_H = 7{,}4$). Um den Einwand, daß der Überfluß von OH-Ionen (d) durch H-Ionen der sauren Lösung (b) neutralisiert wurde, zu entkräften, wurde der folgende Versuch (14) in umgekehrter Reihenfolge angestellt. Zuerst ließen wir alkalische, dann saure *Locke*sche Flüssigkeit durchströmen. Das Resultat blieb das gleiche. Bei Einleitung saurer Lösung kommt es zu einer Alkalisierung, bei Einleitung alkalischer Lösung in das Gewebe zu einer Ansäuerung. Analoges erhielten wir auch bei den Versuchen der dritten Serie. Dort, wo wir die Stückchen verschiedener Gewebe in ein saures Medium hängten, zeigten sie Neigung, dieses zu alkalisieren, in alkalischem Medium hingegen dieses anzusäuern. Diese außerordentlich wichtige Schutzmaßregel des lebenden Gewebes, die Reaktion des Mediums auszugleichen und sie der normalen zu nähern, ist eine der interessantesten Eigenschaften, die das Gewebe

besitzt. Die Widerstandsfähigkeit eines Organismus gegenüber der Einführung großer Mengen von Säuren und Alkalien ist allgemein bekannt (*Szili, Radsimovskaja* u. a.).

Rückkehrend zum Ausgangspunkt unserer Erörterungen, halten wir uns für berechtigt, folgende Schlüsse zu ziehen: *Der Durchgang durch ein Gewebe von Lockescher Flüssigkeit mit einer H-Ionenkonzentration, die die Norm jenes Gewebes übersteigt, führt zur Abdissoziation von OH-Ionen zwecks Ausgleichs der Reaktion. Eine Nährflüssigkeit mit geringerem C_H als die Norm bewirkt Abdissoziation von H-Ionen.* Diese Tatsache kann nach unserer Meinung auch die auf den ersten Blick paradoxen Erscheinungen erklären, die wir früher beschrieben.

Bei Betrachtung des Versuchs 14 sehen wir, daß beim Durchleiten alkalischer Flüssigkeit ($p_H = 8{,}1$) die Gewebe ihre Glucose der Flüssigkeit abgaben (b). Nach dem oben erwähnten Gesetz schied die Zelle in dieser Zeit H-Ionen aus (bzw. dissoziierte diese ab). Infolgedessen war sie sozusagen in „saurer Umgebung", welche die chemiko-physikalische Struktur der Zelle in der Richtung der günstigsten Glykoseausscheidung veränderte, d. h. *im ersten Augenblick wirkt Alkali so wie Säure* (Versuche 13d und 15f). Und erst im letzten Augenblick, wenn die Reserve der H-Ionen zu Ende geht, umgibt sich die Zelle mit OH-Ionen und „saugt sich mit diesen an". Von diesem Moment an beginnen die OH-Ionen ihren Einfluß zu zeigen, der darin besteht, daß die Zelle Glykose verbraucht (Versuche 13e und 15g).

Im Versuch 15 beobachten wir, daß in den beiden ersten Perioden (b und e) der Durchleitung saurer *Locke*scher Flüssigkeit fast keine Veränderungen auftreten, indem die Gewebe fortfahren, hinreichende Mengen von OH-Ionen abzudissoziieren (p_H der Ausströmungsflüssigkeit = 6,6). In der dritten Periode (d), in der die H-Ionen schon viel träger neutralisiert werden, ist das Resultat ihrer Wirkung augenscheinlich.

Zusammengefaßt, läßt sich aus unseren Versuchen folgendes schließen:

1. Die Einführung einer überschüssigen Menge von OH-Ionen in das Blut von Kaninchen ruft eine Hypoglykämie hervor.

2. Die Einführung einer überschüssigen Menge von H-Ionen in das Blut von Kaninchen erzeugt eine Hyperglykämie.

3. Die unter 1. und 2. erwähnte Hyper- und Hypoglykämie sind bei normalen Tieren rasch vorübergehende Erscheinungen, indem die die Blutreaktion regulierenden Einrichtungen sehr schnell das plötzlich gestörte Gleichgewicht der H- und OH-Ionen wieder herstellen.

4. Isoliertes lebendes Gewebe, unter sonst entsprechend günstigen Bedingungen in *Locke*sche Lösung mit p_H gleich größer als normal (7,4) eingebracht, verbraucht aus dieser Lösung Glykose, bei entgegen-

gesetzten Bedingungen aber scheidet es Glykose in die umgebende Nährflüssigkeit aus.

5. Überlebende Extremitäten von Kaninchen, die von *Locke*scher Nährflüssigkeit durchleitet werden, reagieren auf die Einführung von Säure und Alkali innerhalb bestimmter Schwankungsgrenzen nach beiden Seiten des Gleichgewichts der H- und OH-Ionen ebenso wie isoliertes Gewebe (Schlußfolgerung 4).

Unsere Schlußfolgerungen stimmen vollkommen überein mit den Erhebungen von *Rona* und *Wilenko*, welche zeigten, daß die Einverleibung von Zucker durch überlebende Herzen jäh fällt bei Erhöhung der Konzentration der H-Ionen (mit p_H = 7,35 bis 6,5) der Durchspülungsflüssigkeit.

Die von uns gewonnenen Resultate zeigen mit Bestimmtheit, daß die H-Ionenkonzentration des Nährmittels, in welcher die Zelle sich befindet, mitsamt ihren Eigentümlichkeiten infolge ihrer halbdurchlässigen Membran, einen bedeutsamen, ursächlichen Faktor im Prozeß der Abgabe bzw. Zurückhaltung der Glykose darstellt. Auch hier kamen wir folgerichtig zu jenem Moment, wo sich wissenschaftliches Denken noch tiefer in das intime Leben der Zelle versenkt. Wenn früher *Loeb* zeigte, daß die Schwankungen der OH- und H-Ionen gewaltige Bedeutung besäßen bei Reizungsvorgängen der Zelle (Membranbildung im Ei des Seeigels), so betreten wir jetzt schon den Weg, der uns den allgemeinen Begriff „Reizung" in eine ganze Reihe einzelner, ihn formender Momente zu zerlegen verspricht. Und die Festlegung eines bestimmten Bandes zwischen der Reaktion der Nährflüssigkeit und dem Glykoseaustausch zwischen ihr und der Zelle (d. h. der Änderung des Chemismus der Zelle) — dies ist einer von jenen zagen Schritten, die vor uns reiche, an Inhalt tiefe und wichtige Perspektiven eröffnen.

Gleichwohl darf man nicht zu weit gehen und glauben, die Reaktion des Mediums wäre schon alles. Ich erlaube mir daher, einige Worte aus der Rede einer der größten Autoritäten modernen medizinischen Denkens, *Spiros*, zu zitieren: „Es gibt wohl kaum", sagt er, „einen anderen, so allgemeinen Reizerreger, als die Elektrolyten, und wir sind natürlich im vollkommenen Recht, zu behaupten, daß es keinen Lebensprozeß gibt, bei welchem sich nicht entweder der Antagonismus zwischen H- und OH-Ionen oder der Pseudoantagonismus zwischen K- und Ca-Ionen zeigen ließe." Und schon *Elias* zeigte die Wirkung des Phosphors auf den Kohlehydratstoffwechsel.

IV.

Die von uns oben angeführten Schlußfolgerungen versuchten wir im weiteren auf die Pathologie des Kohlenhydratstoffwechsels in Anwendung zu bringen.

Am 4. August wurde bei einem Hunde die Bauchspeicheldrüse entfernt.

Am 5. August wurde im Urin Zucker festgestellt (Probe nach *Trommer*).

Vom 7. August an wurden am Hunde Beobachtungen angestellt. Die Versuche begannen am Morgen. Bis zur Beendigung der Versuche bekam das Tier weder zu fressen noch zu trinken.

1. Beobachtung.

7. August. Durch eine Magensonde werden dem Tiere 20 g $NaHCO_3$ + 200,0 ccm Wasser eingeführt. Der Zuckergehalt des Blutes wird unmittelbar vor der Einführung der Magensonde nach *Bang* festgestellt.

	Norm	Zeit nach der Einführung der Soda				
		33′	50′	1h 27′	2h 07′	3h 10′
	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
Zuckergehalt des Blutes	0,34	0,237	0,239	0,277	0,254	0,233

Bemerkung: 62 Minuten nach der Einführung der Soda trat beim Hunde nicht starkes Erbrechen auf. Die erbrochenen Massen wurden vom Tiere sofort wieder aufgeleckt.

Aus dieser Beobachtung ist zu ersehen, daß die Einführung der Soda den Zuckergehalt des Blutes jäh erniedrigte. Diese Erniedrigung ist von langer Dauer. In den verschiedenen Zeiträumen werden Schwankungen in der Blutzuckermenge beobachtet, was augenscheinlich durch die Schwankungen in der Aufsaugung der Soda begründet ist.

2. Beobachtung.

9. August. Mit der Magensonde werden dem Tiere 10 g Soda und 150 g Wasser eingeführt. Der normale Zuckergehalt des Blutes wird vor Einführung der Magensonde bestimmt.

	Norm	Zeit nach der Einführung der Soda			
		28′	60′	2h 30′	4h
	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
Zuckergehalt des Blutes	0,236	0,233	0,205	0,210	0,2

Bei diesem Versuche wurde zweimal weniger Soda eingeführt als beim ersten Versuch. Aber auch hier ließ sich eine Erniedrigung des Blutzuckergehalts beobachten, freilich eine nicht so starke, wie beim ersten Versuch. aber ebenfalls anhaltende.

3. Beobachtung.

Bei diesem und dem nächstfolgenden Versuche gingen wir von der allgemein bekannten Tatsache aus, daß Einführung von Zucker per os bei einem normalen Tiere eine rasch vorübergehende Hyperglykämie zur Folge hat, daß bei einem Diabetiker hingegen diese Hyperglykämie sehr lange andauert. Deswegen schien uns die gleichzeitige Verabreichung von Soda mit Zucker bei experimentellem Diabetes besonders wichtig.

	Norm	Zeit nach Einführung der Glucose			
		18′	32′	68′	2h 5′
	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
Zuckergehalt des Blutes	0,209	0,233	0,322	0,345	0,330
Unterschied im Vergleich mit der Norm in Proz.	—	+6,7	+54	+65	+58

10. August. Mit der Magensonde wurde dem Hunde eingeführt: 10 g Glykose (*Merck*) + 200,0 ccm Wasser. Der normale Gehalt des Blutes an Zucker wurde unmittelbar vor der Einführung der Magensonde bestimmt.

4. Beobachtung.

11. August. Mit der Magensonde wurden dem Hunde 10 g Glucose + 15 g Soda + 100 g Wasser eingeführt. Der normale Gehalt des Blutes an Zucker wurde vor der Einführung der Magensonde bestimmt.

	Norm	Zeit nach Einführung v. Glucose u. Soda			
		19′	33′	65′	2h
	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
Zuckergehalt des Blutes	0,253	0,196	0,294	0,274	0,205
Unterschied im Vergleich mit dem normalen Zuckergehalt des Blutes in Proz.	—	−22,5	+16	+ 8,3	−15

Der Unterschied zwischen der Einführung von Glucose allein und Einführung von Glucose mit Soda zusammen ist ein großer. Zur selben Zeit, da nach Einführung von Glucose allein die Vermehrung des im Blute befindlichen Zuckers 6,7, 5,4, 65 und 58 Proz. erreicht, erhalten wir bei gleichzeitiger Einführung von Zucker und Soda vollkommen verschiedene Zahlen: — 22,5, + 16, + 8,3, — 15 Proz.

Vergleichsdiagramm auf Grund der Beobachtungen 3 und 4.

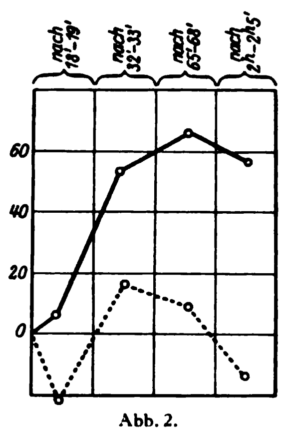


Abb. 2.
——— Veränderungen des Zuckergehalts des Blutes nach Einführung von 10 g Glucose.
.... Veränderungen des Zuckergehalts des Blutes nach Einführung von 10 g Glucose + 15 g Soda.

Rückkehrend zu dem Grundgedanken, den wir in unseren Schlußfolgerungen aussprachen, sehen wir, daß er seine Bestätigung fand am experimentellen Diabetes, diesem für unsere Arbeit so außerordentlich wichtigen Beispiel. Wir müssen jetzt ein neues Kapitel in die Lehre des Diabetes einführen, in welchem das Gleichgewicht der H- und OH-Ionen weitaus nicht die letzte Rolle spielt. Wir kennen nicht den Mechanismus der im Organismus vor sich gehenden Veränderungen. Wir wissen nicht, handelt es sich hier um einen nicht kompensierten Überschuß an Säure oder einen nicht

kompensierten Mangel an Basen. Aber wir wissen, daß zur Herstellung des Gleichgewichts beim pankreatischen Diabetes Alkali nötig ist. Und im Bestreben, die Pathogenese eines gegebenen Falles von Diabetes zu erforschen, darf man nicht das Ionengleichgewicht vergessen. Auch dem ist Rechnung zu tragen, daß es sich um eine selbständige (primäre) Erkrankung mehrerer Gewebe des Organismus handeln kann, bei der das Blut mit Säureionen überschwemmt wird, die ihrerseits Hyperglykämie hervorrufen können. Die Bauchspeicheldrüse und andere den Kohlenhydratstoffwechsel regulierende Organe können hierbei vollkommen normal funktionieren. Dies ist immer in Betracht zu ziehen.

Möglich ist auch eine systematische Zufuhr von Säuren von außen. Es gibt Hinweise auf die Ausscheidung von Bakterien mit dem Kote von Diabetikern (B. amyloclasticus intestinalis), die die Fähigkeit besitzen, Aceton, Acetessigsäure und β-Oxybuttersäure zu bilden (*Renshaw* und *Fairbrother*, *Berthelot* und *Orsait*).

Literatur.

Peters und *Gleylin*, zitiert nach *Tatum*. — *Tatum*, Kongreßzentralbl. f. d. ges. inn. Med. **29**, H. 7. — *Elias* und *Sammartino*, diese Zeitschr. **117**. — *Moraczewski* und *Lindner*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **121**, 1917. — *Tatum* and *Atkinson*, Journ. of biol. Chem. **54**, 2, 1922. — *Pollak* und *Fröhlich*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **74**, 1914. — *Kretschmer*, ebendaselbst **57**, 1907. — *Underhill*, Journ. of biol. Chem. **25**, 1916. — *György* und *Herzberg*, diese Zeitschr. **140**, 1923. — *Gottschalk* und *Pohle*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **94**, 1922. — *Beumer*, Zeitschr. f. Kinderheilk. **35**, H. 5/6, 1923. — *Petenyi* und *Lax*, diese Zeitschr. **125**, 1921. — *Beumer* und *Schäfer*, Zeitschr. f. Kinderheilk. **28**, 1922. — *Snyder* and *Martin*, Kongreßzentralbl. f. d. ges. inn. Med. **31**, H. 7, 1924. — *Mc Carison*, Brit. med. Journ. Nr. 3238, 1923. — *P. Ehrlich*, Arch. f. d. ges. Physiol. **121**. — *Elias*, diese Zeitschr. **48**, 1913. — *Torres-Umaña*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **37**, H. 2, 1923. — *György* und *Vollmer*, diese Zeitschr. **140**, H. 4/6. — *Lesser*, diese Zeitschr. **119**, 1921. — *Szili*, Pflügers Arch. **115**, 1906. — *Michaud*, zitiert nach *Gottschalk* und *Pohle*. — *W. W. Radzimowskaja*, Diese Wirkung H/OH-Ionen auf die Zellen. Kiew 1924. — *Rona* und *Wilenko*, diese Zeitschr. **59**, 1914. — *Renshaw* und *Fairbrother*, zitiert nach *Henriques*, Kongreßzentralbl. f. d. ges. inn. Med. **29**, H. 4, 1923. — *Langfeldt*, Journ. of biol. Chem. **46**, 2, 1921. — *Bollmann*, *Magath* und *Mann*, Ber. über d. ges. Physiol. u. exper. Pharm. **26**, H. 3, 1924.

Vitaminstudium.

Über das Verhalten des B-Vitamins gegenüber Reduktionsprozessen.

Von

Eugen Kramár.

(Aus der Kinderklinik der königl. ungar. „Elisabeth"-Universität, Pécs.)

(Eingegangen am 13. November 1924.)

Mit 1 Abbildung im Text.

I.

Die Probleme der Vitaminlehre erfuhren durch die Forschungen des letzten Dezenniums unerhofft große Fortschritte. Wenn die chemische Definition der Vitamine uns auch noch nicht gelang, so kamen doch zahlreiche, bis jetzt kaum geahnte Details der Vitaminwirkungen ans Tageslicht, deren Rolle in der Menschen- und Tierpathologie zu immer größerer Bedeutung anwächst. Viel mühsame Arbeit ist in den mit dem Vitaminproblem sich befassenden Mitteilungen niedergelegt, es finden sich jedoch bei sorgfältiger Durchsicht derselben trotzdem Fragen, die noch einer Detailbearbeitung bedürfen oder bei deren Beantwortung die Forscher noch nicht einig sind, ja wir finden sogar einander ganz widersprechende Angaben.

Diese Untersuchungen wurden größtenteils an Versuchstieren angestellt, und so war die erste Aufgabe, das Vitaminbedürfnis dieser Tiere zu bestimmen; denn nur bei Kenntnis derselben war ja möglich, die einfachen und kombinierten Vitaminwirkungen zu studieren. Um so auffallender ist es, daß die Meinungen eben betreffs des Vitaminbedürfnisses der Ratten, also des meist gebrauchten Versuchstieres, sich nicht decken. Nach den meisten Forschern genügt das Zusammentreffen von A- und B-Vitaminen in der Testnahrung vollkommen, um die normale Entwicklung der jungen Ratten zu sichern. Aber bereits *Funk* weist darauf hin, daß das Wachstum solcher Ratten, mit der Gewichtskurve normal ernährter Tiere verglichen, doch nicht als normale Entwicklung bezeichnet werden kann. Neuestens vertritt *Tönnies* ganz ausdrücklich den Standpunkt, daß junge Ratten zur normalen Entwicklung alle drei bis jetzt bekannten Vitamine benötigen.

Die Aufgabe dieser Abhandlung war zum Teil, eben diese Frage noch einmal aufzurollen. Zu diesem Zwecke wurden häuslich gezüchtete, womöglich aus einer Generation herstammende junge weiße Ratten

von 40 bis 50 g Körpergewicht mit folgender vitaminfreien Testnahrung ernährt (nach *Glanzmann*):

Casein (mit Alkohol gereinigt)	18,00 Proz.
Weizenstärke	56,00 ,,
Rohrzucker	20,00 ,,
Agar-Agar	2,30 ,,
Salzgemisch	3,70 ,,

Die Zusammensetzung des Salzgemisches:

NaCl	5,19 ,,
$MgSO_4$	7,98 ,,
Calciumlactat	39,00 ,,
Ferrum citricum	3,54 ,,
NaH_2PO_4	10,41 ,,
K_2HPO_4	28,62 ,,
Spur Jod.	

Bei Übergang auf diese Nahrung gewann in den ersten Tagen fast jedes Tier etwas an Gewicht (avitaminotische Steigerung nach *Groebbels*), später jedoch bei gleichbleibender Nahrung nach einem längeren, 10 bis 14 Tage anhaltenden Gewichtsstillstand stellte sich bei jedem Tiere anfangs eine nur langsame Gewichtsabnahme, später schon ein Gewichtssturz ein, das Fell wurde struppig, die Bewegung müde und schleppend, endlich lagen die Tiere stundenlang zusammengekauert in ihrem Käfig und gingen schließlich nach zunehmender Schwäche ein. Die bei vitaminfreier Nahrung sich einstellende anfängliche Gewichtszunahme dauert bei jungen Ratten kaum 4 bis 5 Tage, die Gewichtsabnahme begann gewöhnlich am 14. bis 18. Tage, die Lebensdauer der Ratten betrug im Durchschnitt 40 bis 55 Tage.

Wir gingen nun zur Beobachtung der verschiedenen Vitaminwirkungen auf das Wachstum der Ratten über. Als „A" wurde Lebertran verabreicht in einer Menge von 10 Proz. der Gesamtnahrung, „B"-Vitamin gaben wir in Form von Hefe, und zwar 0,2 bis 0,3 g aus reiner Hefe, 0,1 g aus dem wässerig-alkoholischen Extrakt. Als „C"-Vitamin diente Citronensaft. Der zu beobachtende Ergänzungsstoff wurde immer im Beginn des ersten Stadiums der Avitaminose verabreicht, wenn also nach einem längeren Gewichtsstillstand sich eine Gewichtsabnahme einstellte.

I. Gruppe. Vier Ratten wurden im Beginn der Gewichtsabnahme 10 Proz. Lebertran zur vitaminfreien Testnahrung hinzugefügt. In den folgenden Tagen hörte die Gewichtsabnahme auf, ja bei einigen Ratten stellte sich sogar geringe Zunahme ein, die aber nur wenige Tage anhielt, um einer weiteren Abnahme Platz zu geben, so daß die Gewichtskurve und Lebensdauer solcher Ratten mit jener von ganz vitaminfrei ernährten Ratten fast ähnlich war.

II. Gruppe. Vier Ratten gaben wir zum Zeitpunkt der dem Gewichtsstillstand folgenden Abnahme Hefeextrakt („B"-Vitamin). Die Ratten

nahmen darauf allmählich zu; diese langsame Entwicklung dauerte etwa 6 Wochen, sie betrug viertägig nicht mehr als 4 bis 5 g, war also vom normalen Wachstum (10 bis 15 g) weit entfernt. Nach 6 Wochen (vom Beginn des Versuchs gerechnet nach 8 Wochen) stellten sich bei zwei Ratten, bei der dritten nach 9 Wochen, die ersten Spuren einer *Xerosis corneae* ein, begleitet durch Gewichtsstillstand, dann durch Abnahme. Die Krankheit führte bei allen zur totalen Erblindung.

Halten wir vollentwickelte Ratten bei vitaminfreier Nahrung, so kann *Xerosis* mit Leichtigkeit hervorgerufen werden, bei jungen Ratten gelingt es aber — wie es bereits von mehreren Forschern betont wurde — viel seltener. Die Ursache dieser Erscheinung findet sich darin, daß solche jungen Ratten, vitaminfrei ernährt, früher zugrunde gehen, bevor noch die Xerosis sich hätte manifestieren können. Wird aber die Lebensdauer solcher Ratten durch Hefezugabe verlängert, wie es in unseren Versuchen geschah, so sehen wir das Auftreten der Krankheit gar nicht selten.

III. Gruppe. Weiteren vier Ratten wurde nach zweiwöchiger vitaminfreier Ernährung „*A*“ zusammen mit „*B*“ verabreicht, worauf die bisher abwärts haltende Gewichtskurve steil anstieg; die weitere Entwicklung war auch durch längere Zeit befriedigend, sie konnte jedoch im Vergleich zum Wachstum gewöhnlich ernährter Ratten nicht als normal bezeichnet werden, da sie durchschnittlich nicht mehr als 8 bis 10 g in 4 Tagen betrug. Geben wir aber neben den zwei genannten Vitaminen noch Citronensaft, so gestaltet sich die Entwicklung ähnlich wie bei normalen Ratten.

II.

Die Widerstandsfähigkeit verschiedener Vitamine den diversen äußeren Einwirkungen gegenüber stellt ein gut bearbeitetes Kapitel der Vitaminlehre dar. Es ist bekannt, daß manche Vitamine sehr empfindlich gegen Hitze sind, andere gegen Austrocknung, wir kennen die Widerstandskraft der einzelnen Vitaminarten gegenüber Säure, Alkali, Oxydation. So wissen wir, daß, während Vitamin „A“ und „B“ thermoresistent sind und ihre Wirkung durch Säure, Alkali und Austrocknung kaum geschädigt wird, sich das „C“-Vitamin allen diesen Einwirkungen gegenüber als hochgradig empfindlich zeigt.

Es ist sonderbar, wie wenig das Verhalten der Vitamine gegenüber Reduktionsprozessen studiert wurde. In der Monographie von *Funk* findet man nur so viel, daß „die das Hefewachstum beschleunigende Substanz“ der durch kolloidales Palladium und Wasserstoff sowie durch Zink-Salzsäure hervorgerufenen Reduktion widersteht. Und doch ist die Reduktion derjenige Prozeß, mit welchem die in den tierischen Organismus gelangten Vitamine schon im Darmtrakt in nähere Beziehung kommen müssen und der unter pathologischen Verhältnissen, besonders im Säuglingsalter, abnorme Höhe erreichen kann.

Auf Grund unserer mit *Éderer* gemeinschaftlich angestellten Versuche wurde schon lange die Frage aufgeworfen, ob der abnorm übermäßige Reduktionsprozeß im Darme beim Milchnährschaden nicht in Beziehung zu jenen Symptomen stände, die dieser Krankheit ihr unleugbar avitaminoseartiges Gepräge verleihen. Wir dachten nämlich daran, daß derselbe bakteriochemische Prozeß, der die Entfärbung der Stühle verursacht, gleichzeitig auch die Vitamine der Nahrung schädigen könnte. Zur Ergründung der von uns aufgestellten Theorie „*der Milchnährschaden ist eine endogene A- oder richtiger Hypovitaminose*“ wurden Modellversuche angestellt und nachgewiesen, daß der Malzextrakt während seiner in schwach alkalischem Medium vorgenommenen Reduktion viel von seiner die Methylenblauatmung der Rattenleberzellen fördernden Eigenschaft einbüßt.

Zur weiteren Beweisführung stellten wir nun auch Tierversuche an, die zur Aufgabe hatten, die Wirkung der Reduktion auf den alkoholischen Hefeextrakt bei verschiedener Reaktion zu prüfen. Zu diesem Zwecke wurde Hefe durch 70proz. Alkohol extrahiert, der so erhaltene wässerig-alkoholische Extrakt 1. im sauren Medium durch Zink-Salzsäure, 2. mit Hilfe von Aluminiumamalgam bei schwach alkalischer Reaktion 8 Stunden lang reduziert. Es fiel schon im Laufe der Reduktion auf, daß, während im ersten Falle die dunkelgelbe Farbe des Hefeextraktes fast unverändert blieb, bei alkalischer Reaktion sie allmählich lichter wurde, und Hand in Hand verschwand auch der charakteristische Geruch der Hefe. Nach 8 Stunden wurden die Extrakte durch Papier filtriert, neutralisiert und eingedampft. Die so vorbehandelten Vitaminextrakte reichten wir den Ratten ebenso wie den unveränderten Auszug.

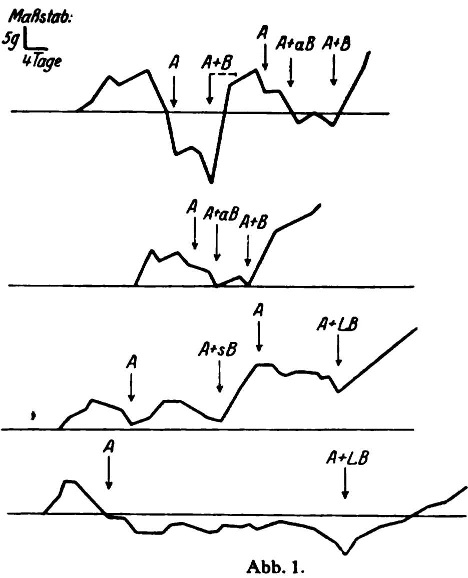


Abb. 1.

Wir wir aus der Gewichtskurve unseres neunten Versuchs ersehen, beginnt die Ratte nach dem der anfänglichen Gewichtszunahme folgenden Stillstand am 14. Versuchstage allmählich abzunehmen. Nach 4 Tagen wird der Grundnahrung Lebertran zugefügt, ohne daß die Gewichtskurve dadurch wesentlich beeinflußt worden wäre. Der neben dem

Lebertran gereichte Hefeauszug löst schon eine starke Reaktion aus zum Zeichen dafür, daß die Ratte sich noch im ersten avitaminotischen Stadium befand. Beim Weglassen beider Vitamine hört die weitere Gewichtszunahme auf, es stellt sich bald eine Abnahme ein, die nicht durch wieder gereichten Lebertran selbst mehr zu beheben war. *Bei Beibehaltung des Lebertrans wurde nun am 42. Tage des Versuchs alkalisch-reduzierte Hefe gegeben, ohne jedoch irgendwelche Wirkung vermerken zu können.* Zur Entscheidung, ob die Ratte überhaupt noch die Fähigkeit besitzt, auf Hefe zu reagieren, tauschten wir am 46. Tage den reduzierten Extrakt mit dem unveränderten Auszug um, worauf das Gewicht wieder steil anstieg.

Die Gewichtskurve unserer zehnten Ratte demonstriert gleichartig, daß, während der alkalisch-reduzierte Auszug keinen Effekt besitzt, der nachher verabreichte unveränderte Hefeextrakt eine unverkennbare Wirkung ausübt.

Nach der Feststellung, daß der Hefeauszug durch Reduktion im alkalischen Medium in seiner Wirkung nachweisbarerweise geschädigt wird, wurde des weiteren das Verhalten desselben Vitamins gegenüber bei saurer Reaktion vorgenommener Reduktion geprüft. Wie aus dem 12. Versuch zu ersehen ist, behält das unter gleichen Verhältnissen verabreichte „B"-Vitamin seine Wirkung selbst nach der sauren Reduktion bei.

Nach diesem Resultat ergab sich die Vermutung, ob nicht die während der Aluminiumamalgamreduktion entstandene Alkalinität an der Diskrepanz zwischen der Wirkung der alkalischen und sauren Reduktion schuld wäre. Zur Entscheidung dieser Frage stellten wir folgenden Versuch an.

Es wurde der wässerig-alkoholische Auszug 8 Stunden lang einer Reduktion unterworfen und waren nach 8 Stunden zur Neutralisation von 10 ccm dieses Extraktes 2,4 ccm n/10 HCl nötig. Andere Portionen dieses Auszuges wurden daher ohne Reduktion im obigen Verhältnis alkalisiert, verschieden lange stehengelassen, nachher neutralisiert und eingedampft. Unser 12. Versuch zeigt, daß, als die Gewichtskurve nach Auslassen des sauer reduzierten Hefeauszuges erflachte, es uns durch Zugabe von 8 Stunden lang mit Lauge vorbehandeltem Hefeextrakt eine fast gleichwertige Reaktion zu erzielen gelang, wie mit dem unveränderten Auszug. Selbst 5 Tage lange Einwirkung solcher Laugenkonzentration war nicht imstande, die Hefewirkung vollkommen aufzuheben. — *Nach diesem Kontrollversuch mußte doch angenommen werden, daß der im alkalischen Medium sich abspielende Reduktionsprozeß selbst es war, der den Hefeauszug geschädigt hatte.*

Die Bedeutung dieser Versuche erblicken wir darin, daß die alkalische Reduktion diejenige ist, die die in dem Darmkanal sich abspielenden

natürlichen Reduktionsprozesse am besten nachahmt, so daß, wenn die obigen Versuche auch nur als Modellversuche betrachtet werden können, sie doch mit großer Wahrscheinlichkeit dafür sprechen, daß die Nahrungsvitamine durch die in dem Darmkanal ablaufenden, abnorm gesteigerten Reduktionsprozesse in ihrer Wirkung beeinflußt werden können.

Zusammenfassung.

1. „A“-Vitamin (Lebertran) läßt das Wachstum vitaminfrei ernährter junger Ratten selbst in dem ersten Stadium der Avitaminose unbeeinflußt oder es ruft höchstens eine geringe, kurzdauernde Ausschwingung in der Gewichtskurve hervor. Vitamin „A“ ist nicht imstande, den Eintritt der Avitaminose zu verhindern.

2. „B“-Vitamin (Hefeextrakt) unter ähnlichen Verhältnissen verabreicht, hat eine langsame, gleichmäßige Gewichtszunahme zur Folge, die aber bei der normalen Entwicklung der Ratte weit zurückbleibt. Bei ausschließlicher Hefezugabe tritt selbst bei jungen Ratten Xerosis corneae leicht ein.

3. Die gleichzeitige Anwesenheit von „A“ und „B“ in der Testnahrung genügt, um die Ratten am Leben zu erhalten; das Wachstum solcher Ratten scheint auf den ersten Blick ganz zufriedenstellend, es steht jedoch hinter dem von normalen Tieren.

4. „A“ + „B“ + „C“ stellt das wahre Vitaminbedürfnis der Ratte dar.

5. Xerosis corneae kann auch bei jungen Ratten am leichtesten hervorgerufen werden, wenn zur vitaminfreien Testnahrung längere Zeit hindurch „B“-Vitamin zugefügt wird. Dieses schiebt den Eintritt des avitaminotischen Zustandes hinaus und ermöglicht dadurch das Auftreten der Xerosis corneae. Ganz vitaminfrei ernährt, gehen nämlich junge Ratten früher zugrunde, bevor die Krankheit sich hätte einstellen können.

6. Vitamin „B“ (Hefeextrakt) widersteht der in saurem Milieu verlaufenden Reduktion.

7. Die Wirkung des „B“-Vitamins wird durch Reduktion im schwach alkalischen Medium vernichtet oder abgeschwächt.

8. Kontrollversuch: Durch Lauge in solch geringer Konzentration wird das „B“-Vitamin wesentlich nicht beeinflußt.

Literatur.

Éderer und *Kramár*, Klin. Wochenschr. 1923; Oroosi Hetilap **88**, 1923. — *Funk*, Die Vitamine. — *Glanzmann*, Schweiz. med. Wochenschr. 1922, Nr. 3/4. — *Tönnies*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **136**, 1924.

Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung des Insulins auf die äußere Sekretion der Verdauungsdrüsen.

I. Mitteilung: Insulinwirkung auf die Sekretion des Magensaftes.

Von

J. A. Collazo und **Minko Dobreff.**

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 25. November 1924.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Die wichtige Frage, ob das Insulin auf das autonome Nervensystem Einfluß besitzt, kann nicht als eindeutig entschieden betrachtet werden. Die Schwierigkeiten hängen wohl zum Teil mit der fehlenden chemischen Reindarstellung des Hormons zusammen.

Dudley[1]) fand, daß das *rohe* Insulin den Blutdruck bei Kaninchen senkt, was bei reineren Präparaten (Insulinhydrochlorid) nicht der Fall ist. *Grevenstück*, *Laquer* und *Riehensohm*[2]) konnten in der Blutdruckkurve keine Veränderung durch Insulin feststellen. *Klemperer* und *Strisower*[3]) haben bei Diabetikern mit Hypertonie eine Blutdrucksenkung beobachtet. *Von Noorden* und *Isaak*[4]) fanden beim Rückgang der Hyperglykämie eine Blutdrucksenkung. *Collazo* und *Händel*[5]) konnten weder durch Herzversuche noch durch Beobachtung der Wirkung auf die Pupille Anhaltspunkte für die Nervenwirkung des Insulins gewinnen (Iletin und Insulin von *Funk*). *Garrelon* und *Santenoise*[6]) glauben, daß das Insulin eines der stärksten Vagusmittel ist. Die Versuche ergaben: Verlangsamung der Atmung und des Herzschlages, Verstärkung der Systole, Senkung des Druckes, Vermehrung der Reflexerregbarkeit. *Kognan*[7]) sah an Froschherzen eine Verlangsamung nach Insulin. Endlich sah *Popper*[8]) keine be-

[1]) *H. W. Dudley*, The Biochem. Journ. **17**, 376, 1923.
[2]) *Grevenstück*, *Laquer* und *Riehensohm*, Nederl. Tijdschr. u. Geneesk. **16**, 1923.
[3]) *Klemperer* und *Strisower*, Wien. klin. Wochenschr. **38**, 1924.
[4]) *Von Noorden* und *Isaak*, Klin. Wochenschr. **17**, 1923.
[5]) *Collazo* und *Händel*, Deutsch. med. Wochenschr. **51**, 1923.
[6]) *Garrelon* und *Santenoise*, C. r. d. l. Soc. de Biol. **88**, Nr. 7, S. 470, 1924.
[7]) *Kognan*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **42**, 25, 1924.
[8]) *Popper*, C. r. d. l. Soc. de Biol. **89**, 25, 510, 1924.

merkbare und konstante Änderung der Vaguserregbarkeit. Sein Experiment bestand in der Feststellung der zur Erzeugung des Herzstillstandes nötigen Stromintensität. Das stimmt mit den Befunden von *Collazo* und *Händel* überein. Zum selben Ergebnis gelangte *Labbé*[1]) in seinem Versuch über die Wirkung des Insulins auf den Oculo-cardiaque-Reflex. Jedoch zeigte sich oft bei mit Insulin eingespritzten Tieren eine sympathicotonische Wirkung.

Bei der Elektrokardiogrammkurve bei Diabetikern zeigte sich eine Änderung, welche *Wittgenstein* und *Mendel*[2]) als eine spezifische Wirkung des Insulins bezeichnen. Nach *Csepaik* und *Weiss*[3]) ist die Wirkung des Insulins auf das Herz keine primäre, sondern eine sekundäre Folge der Wirkung auf den Zuckerstoffwechsel. Die Autoren haben den Einfluß des Insulins auf die Adrenalinempfindlichkeit als Maßstab zu ihren Versuchen bei Menschen verwendet. In den Versuchen über die Insulinwirkung auf den isolierten Kaninchendarm haben *Winter* und *Smith*[4]) festgestellt, daß durch Insulinzusatz zur *Ringer*schen Lösung eine deutliche Verlangsamung der Darmkontraktionen hervorgerufen wird, welche die Autoren als eine depressorische Wirkung des Insulins auf das Vagussystem oder eine Erregung der inhibitorischen Sympathicusendigungen erklären.

Bei der weiteren Verfolgung dieser Fragen haben wir die Wirkung des Insulins auf die Magensekretion studiert, worüber wir in einer vorläufigen Mitteilung berichteten[5]). Über einen Einfluß des Insulins auf Sekretionen besteht eine Angabe von *Guisti* und *Rietti*[6]), die eine Verminderung der Milchsekretion bei erhöhter Fettkonzentration beschreiben. *Brugsch* und *Horsters*[7]) haben einmal am Hunde eine Vermehrung der Gallensekretion nach Insulingabe gesehen. *Ivy* und *Fisher*[8]) haben aus der Magen- und Duodenalschleimhaut insulinähnliche Substanzen isoliert, was wenig Bedeutung bei der weiten Verbreitung der Insuline besitzt.

Unsere Versuchsanordnung war folgende:

Die Versuche wurden an drei *Pawlow*schen Magenblindsackhunden und an einem gewöhnlichen Magenfistelhund ausgeführt. Der Magensaft wurde in der üblichen Weise in halbstündigen Intervallen gemessen. Die Versuchshunde bekamen immer einmal in 24 Stunden ihre Nahrungsration (etwa 15 bis 20 Stunden vor den Versuchen). So waren die Tiere immer unter ungefähr gleichen Allgemeinbedingungen.

Wir haben die Tiere fast immer in den Versuch genommen, bevor die Tätigkeit der Schleimhaut im Anschluß an die letzte Nahrungs-

---

[1]) *M. Labbé*, C. r. d. l. Soc. de Biol. **91**, 1924.
[2]) *Wittgenstein* und *Mendel*, Klin. Wochenschr. **25**, 1924.
[3]) *Csepaik* und *Weiss*, ebendaselbst **38**, 1924.
[4]) *L. B. Winter* und *W. Smith*, Journ. of Physiol. Proceeding of the physiol. sty, Nr. 58, S. 4–8, 1924.
[5]) *Collazo* und *Dobreff*, Klin. Wochenschr. **27**, 1924.
[6]) *Guisti* und *Rietti*, C. r. d. l. Soc. de Biol. **89**, 1924.
[7]) *Brugsch* und *Horsters*, Med. Klinik Nr. 20, 1924.
[8]) *A. Ivy* und *N. Fisher*, Journ. of Physiol. **67**, 1924.

ingestion zu völligem Stillstand gekommen war, um möglichst kräftige Sekretionen zu erhalten, bei denen dann der hemmende Einfluß des Insulins nur um so deutlicher in Erscheinung treten mußte. An diesen Hunden haben wir immer zunächst zur Kontrolle das Verhalten des Magenblindsackes 1 bis 2 Stunden verfolgt, ehe wir zu den Versuchen schritten.

Die zur Injektion gelangenden Substanzen wurden teils subkutan am Rücken, teils intravenös am Beine eingespritzt. Wir haben die Wirkung des Insulins am fast nüchternen Tiere, ferner am Tiere nach Fleischzufuhr, nach Spinatsekretininjektionen und nach Pilocarpininjektion studiert. Es stand uns das von *Casimir Funk* in der biochemischen Abteilung des Hygienischen Instituts in Warschau hergestellte Insulinhydrochloridpräparat zur Verfügung. Die bei unseren Versuchen gebrauchten Sekretinlösungen wurden durch Hydrolysieren der Spinatblätter mit 5proz. Schwefelsäure hergestellt [vgl. hierzu die Vorschriften bei *Dobreff*[1])]. Weitere Einzelheiten sind aus den Versuchsprotokollen zu ersehen.

Wir fassen die Ergebnisse zusammen:

1. Eine Insulininjektion von 2 bzw. 3 Kanincheneinheiten, bei etwa 12 kg schweren Hunden, ruft bei einem in Anschluß an eine mehrere Stunden voraufgegangene Ingestion schwach sezernierenden Fundusblindsackhunde eine ausgesprochene Hemmung der Magensaftsekretion hervor.

2. *Die sehr reichliche Sekretion, die nach Spinatsekretin (Bickel) auftritt, wird durch Insulin hochgradig gehemmt.*

3. Die Sekretionskurve nach Fleischgenuß wird durch Insulin abgeflacht.

4. Die Pilocarpinsekretion, die durch Vagusreizung erfolgt, wird durch Insulin weitgehend gehemmt.

5. Die Dauer der Hemmung beträgt etwa 1½ Stunden.

Wir berichten im folgenden ausführlicher über unsere diesbezüglichen Versuche über die Wirkung des Insulins auf die Sekretion des Magensaftes.

A. Versuche an im Anschluß an eine vor längerer Zeit voraufgegangene Nahrungsingestion noch schwach sezernierenden Pawlowhunden.

Die hierher gehörigen Versuche wurden so angestellt, daß die Versuchstiere, nachdem sie etwa 18 Stunden nüchtern gewesen waren, zunächst einige Zeit beobachtet wurden in bezug auf die Tätigkeit des kleinen Magens und erst dann 3 Kanincheneinheiten Insulin intra-

---

[1]) *Dobreff*, Münch. med. Wochenschr. Nr. 24, 1924; Deutsch. med. Wochenschr. Nr. 28, 1924.

Tabelle I.

Allgemeine Resultate über die hemmende Wirkung des Insulins auf die Magensaftsekretion bei Pawlowhunden.

Bezeichnung	Saftmenge in ccm ohne Insulin in 3 Stunden	Saftmenge in ccm mit Insulin in 3 Stunden	Gebrauchte Insulindosis (intravenöse Gabe)	Bemerkung
a) *Spinatsekretingabe:*				
1. Versuch, 4. und 2. IV. Hund II ♀	8,0	3,7	2 Kan.-Einh.	
2. Versuch, 2. und 2. IV. Hund I ♀	60,9	17,5	3 „	
3. Versuch, 7. und 7. IV. Hund III ♂	33,2	12,8	3 „	Saftmenge nur von $2^1/_2$ Std.
b) *Fleischgabe:*				
1. Versuch, 9. und 8. IV. Hund I ♀	48,4	28,9	3 Kan.-Einh.	
2. Versuch, 8. und 9. IV. Hund III ♂	41,0	34,2	3 „	
3. Versuch, 14. und 15. IV. Hund III ♂	69,3	40,9	$2^1/_2$ „	
4. Versuch, 25. und 26. IV. Hund III ♂	31,1	11,7	3 „	
5. Versuch, 6. und 7. IV. Hund I ♀	23,2	49,1	2 „	Ungenügende Dosis
c) *Pilocarpingabe:*				
1. Versuch, 8. und 9. IV. Hund II ♀	11,5	3,9	3 Kan.-Einh.	
2. Versuch, 10. und 12. IV. Hund III ♂	22,0	16,2	3 „	
3. Versuch, 14. und 15. IV. Hund I ♀	31,4	34,5	2 „	Ungenügende Dosis

venös (am Beine) eingespritzt erhielten. Das *Resultat* dieser Versuche war folgendes (s. Tabellen II, III und die graphische Darstellung von diesen Versuchen, Abb. 1): Wird während der unter diesen Umständen vorhandenen geringen Magensekretion Insulin intravenös injiziert, so sinkt die abfließende Magensaftmenge rapid — Maximum in 1 bzw. 1½ Stunden (bei dem einen Versuch bis zur Null!); dann setzt der Magensaftabfluß wieder rapid ein und erreicht nach etwa noch 1 Stunde das Niveau, das er vor der Insulininjektion gehabt hat. Es ist interessant zu bemerken, daß eine Insulininjektion von 2 Kanincheneinheiten fast immer gar keine Veränderung des Verlaufs dieser Magensaftkurve bewirkte.

B. Wirkung auf die Fleischkurve.

Diese Versuche wurden so angestellt, daß immer, nachdem mit jedem Versuchshunde an einem Tage eine normale Fleischkurve zur Kontrolle aufgenommen worden war, am nächsten Tage gleichzeitig mit der Fleischgabe auch eine intravenöse Insulininjektion gegeben

Tabelle II.

Pawlowhund I, ♀ etwa 11 kg. 23. III. 1924. Wirkung der Insulininjektion bei abklingender Magensekretion nach früherer Fütterung.

Zeit	Magensaft in ccm	
	in 30 Min.	in 60 Min.
9h00′— 9h30′	2,2	
9 30 —10 00	1,3	3,05
10 00 —10 30	1,75	
10h30′	3 Kanincheneinheiten Insulin intravenös	
10h30′—11h00′	1,0	1,0
11 00 —11 30	0,0	
11 30 —12 00	1,4	2,0
12 00 —12 30	0,6	
12 30 — 1 00	1,5	

Tabelle III.

Pawlowhund III, ♂ etwa 12 kg. 25. III. 1924. Wirkung der Insulininjektion bei abklingender Magensekretion nach früherer Fütterung.

Zeit	Magensaft in ccm	
	in 30 Min.	in 60 Min.
9h00′— 9h30′	2,2	
9 30 —10 00	1,75	3,25
10 00 —10 30	1,5	
10h30′	3 Kanincheneinheiten Insulin intravenös	
10h30′—11h00′	1,4	1,9
11 00 —11 30	0,5	
11 30 —12 00	0,35	1,85
12 00 —12 30	1,5	
12 30 — 1 00	1,0	

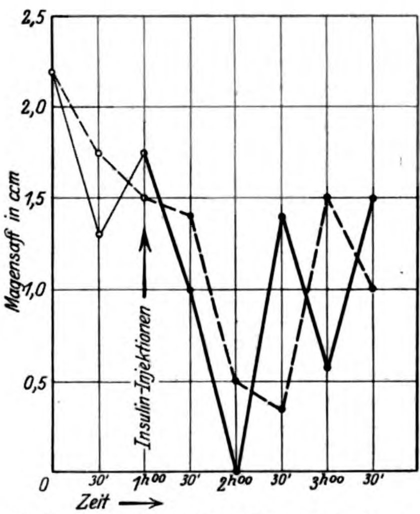


Abb. 1. Pawlowhund I ♀ und III ♂. Wirkung der Insulininjektion bei abklingender Magensekretion nach früherer Fütterung.

wurde oder umgekehrt — am ersten Tage Fleisch + Insulin und dann am nächsten Tage nur Fleisch. So konnten wir die Schwankungen in dem Sekretionsablauf, die man im allgemeinen bei ein und demselben Tiere in verschiedenen Zeiten beobachten kann, möglichst ausschalten.

Das *Ergebnis* dieser Versuche war folgendes: Wird bei nüchternen Hunden nach Beobachtung der Tätigkeit des kleinen Magens während einiger Stunden 200 g frisches gemahlenes Pferdefleisch gegeben, so steigt bekanntlich die Magensekretion schon in der ersten halben Stunde und nimmt dann den bekannten Verlauf. Bei den entsprechenden

Versuchen mit Fleisch + Insulin hat sich in den entsprechenden Zeiten eine deutliche Verminderung der Sekretion gezeigt (s. Tabellen IV bis XI und Abb. 2).

Tabelle IV.

Pawlowhund I, ♀ etwa 11 kg.
9. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach Fleischgabe.

Zeit	Magensaft ccm		Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Fleischgabe
	in 30 Min.	in 60 Min.	
10h00'-10h30'	1,5		
10 30-11 00	2,3	5,1	
11 00-11 30	2,8		
11h40'	200 g gemahlenes Pferdefleisch		
11h30'-12h00'	5,2	13,3	
12 00-12 30	8,1		
12 30- 1 00	10,9	17,3	
1 00- 1 30	6,4		48,4
1 30- 2 00	8,2	17,8	
2 00- 2 30	9,6		
2 30- 3 00	5,5	10,7	
3 00- 3 30	5,2		
3 30- 4 00	5,8		

Tabelle V.

Pawlowhund I, ♀ etwa 11 kg.
8. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach Fleischgabe und gleichzeitige Insulininjektion.

Zeit	Magensaft ccm		Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Injektion
	in 30 Min.	in 60 Min.	
10h00'-10h30'	2,1	3,7	
10 30-11 00	1,6		
11 00-11 30	1,7	3,9	
11 30-12 00	2,2		
12h05'	200 g gemahlenes Pferdefleisch und 3 Kanincheneinheiten Insulin intravenös (am Bein).		
12h00'-12h30'	4,6	12,7	
12 30- 1 00	8,1		
1 00- 1 30	5,9	9,5	28,9
1 30- 2 00	3,6		
2 00- 2 30	3,2	6,7	
2 30- 3 00	3,5		
3 00- 3 30	3,0	5,4	
3 30- 4 00	2,4		

Tabelle VI.

Pawlowhund III, ♂ etwa 12 kg.
8. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach Fleischgabe.

Zeit	Magensaft ccm		Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Fleischgabe
	in 30 Min.	in 60 Min.	
10h00'-10h30'	1,9		
10 30-11 00	1,8	2,7	
11 00-11 30	0,9		
11h40'	200 g gemahlenes Pferdefleisch		
11h30'-12h00'	4,8	8,8	
12 00-12 30	4,0		
12 30- 1 00	5,7	13,2	
1 00- 1 30	7,5		41,0
1 30- 2 00	8,1	19,0	
2 00- 2 30	10,9		
2 30- 3 00	7,2	13,7	
3 00- 3 30	6,5		
3 30- 4 00	9,5		

Tabelle VII.

Pawlowhund III, ♂ etwa 12 kg.
9. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach Fleischgabe und gleichzeitige Insulininjektion.

Zeit	Magensaft ccm		Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Injektion
	in 30 Min.	in 60 Min.	
10h30'-11h00'	1,4	2,0	
11 00-11 30	0,6		
11 30-12 00	1,2	1,4	
12 00-12 30	0,2		
12h35'	200 g gemahlenes Pferdefleisch und 3 Kanincheneinheiten Insulin intravenös (am Bein).		
12h30'- 1h00'	2,1	5,4	
1 00- 1 30	3,3		
1 30- 2 00	6,5	15,6	34,2
2 00- 2 30	9,1		
2 30- 3 00	5,2	13,2	
3 00- 3 30	8,0		
3 30- 4 00	7,6	12,3	
4 00- 4 30	4,7		

Tabelle VIII.
Pawlowhund III ♂ etwa 12 kg.
14. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach Fleischgabe.

Zeit	Magensaft in ccm		Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Fleischgabe
	in 30 Min.	in 60 Min.	
11h30'-12h00'	4,7		
12 00 -12 30	2,7	6,4	
12 30 - 1 00	3,7		
1h00'	200 g gemahlenes Pferdefleisch		
1h00'- 1h30'	9,3	22,9	69,3
1 30 - 2 00	13,6		
2 00 - 2 30	11,7	24,0	
2 30 - 3 00	12,3		
3 00 - 3 30	12,2	22,4	
3 30 - 4 00	10,2		
4 00 - 4 30	9,5	19,6	
4 30 - 5 00	10,1		
5 00 - 5 30	6,6		

Tabelle IX.
Pawlowhund III ♂ etwa 12 kg.
15. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach Fleischgabe und gleichzeitige Insulininjektion.

Zeit	Magensaft in ccm		Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Injektion
	in 30 Min.	in 60 Min.	
10h30'-11h00'	2,0		
11 00 -11 30	1,0	3,4	
11 30 -12 00	2,4		
12h20'	200 g gemahlenes Pferdefleisch und 2,5 Kanincheneinheiten Insulin intravenös (am Bein)		
12h00'-12h30'	3,1	6,8	40,9
12 30 - 1 00	3,7		
1 00 - 1 30	11,2	19,6	
1 30 - 2 00	8,4		
2 00 - 2 30	7,1	14,5	
2 30 - 3 00	7,4		
3 00 - 3 30	8,1	13,8	
3 30 - 4 00	5,7		

Tabelle X.
Pawlowhund III ♂ etwa 12 kg.
25. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach Fleischgabe.

Zeit	Magensaft ccm		Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Fleischgabe
	in 30 Min.	in 60 Min.	
10h30'-11h00'	0,9	2,9	
11 00 -11 30	1,2		
11 30 -12 00	2,0	3,5	
12 00 -12 30	1,5		
12h30'	200 g gemahlenes Pferdefleisch		
12h30'- 1h00'	4,8	10,5	31,1
1 00 - 1 30	5,7		
1 30 - 2 00	7,3	12,4	
2 00 - 2 30	5,1		
2 30 - 3 00	4,2	8,2	
3 00 - 3 30	4,0		

Tabelle XI.
Pawlowhund III ♂ etwa 12 kg.
26. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach Fleischgabe und gleichzeitige Insulininjektion.

Zeit	Magensaft ccm		Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Injektion
	in 30 Min.	in 60 Min.	
11h00'-11h30'	3,7	6,7	
11 30 -12 00	3,0		
12h00'	200 g gemahlenes Pferdefleisch und 3 Kanincheneinheiten Insulin intravenös (am Bein).		
12h00'-12h30'	2,1	3,9	11,7
12 30 - 1 00	1,8		
1 00 - 1 30	3,0	5,0	
1 30 - 2 00	2,0		
2 00 - 2 30	1,5	2,8	
2 30 - 3 00	1,3		
3 00 - 3 30	1,8		
3h30'	2,5 ccm (= 2,5 g Blättertrockensubstanz) Spinatsekretin subkutan.		
3h30'- 4h00'	17,9	19,3	
4 00 - 4 30	1,4		
4 30 - 5 00	1,6	4,1	
5 00 - 5 30	2,5		

Die hemmende Wirkung des Insulins auf die Fleischkurve, die wir bei der kombinierten Fleisch + 3 Kanincheneinheiten Insulingabe

beobachteten, fehlt bei einer Kombinierung der Fleischgabe mit einer Insulininjektion von 2 Kanincheneinheiten. Hier zeigt sich also auch, wie bei den unter A. beschriebenen Versuchen, die Dosis von 2 Kaninchen-

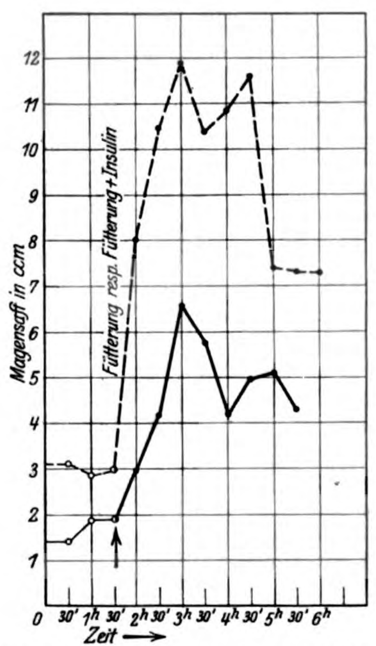


Abb. 2. Pawlowhund I ♀ und III ♂. Verhalten der Magensaftsekretion nach Fleischgabe (○— — —○), bzw. nach Fleischgabe + Insulininjektion (○———○). Durchschnittskurven aus je 4 Versuchen.

einheiten Insulin unwirksam. Das ist aus den beiden folgenden zusammenstehenden Versuchen zu ersehen (Tabellen XII und XIII).

C. Wirkung auf die Sekretinsekretion.

Bei der ersten Gruppe dieser Serie von Versuchen wurde dem Versuchstiere, nachdem wir bei ihm die Magentätigkeit eine bestimmte Zeit beobachtet hatten, subkutan Spinatsekretin (= 2,5 g trockene Blätter) und gleichzeitig eine intravenöse Insulininjektion (2 Kanincheneinheiten) gegeben. Diese Versuche sind mit den ihnen entsprechenden Versuchen, bei denen an demselben Hunde nur die Spinatsekretininjektion gemacht wurde, zu vergleichen (s. Tabellen XIV bis XVII).

Bei zwei an den anderen Hunden gleich angestellten Versuchen hat sich die Dosis von 2 Kanincheneinheiten Insulin als unwirksam gezeigt.

Tabelle XII.

Pawlowhund I, ♀, etwa 11 kg.
6. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach Fleischgabe.

Zeit	Magensaft ccm		Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Fleischgabe
	in 30 Min.	in 60 Min.	
11h00'-11h30'	1,0		
11 30 -12 00	2,3	3,5	
12 00 -12 30	1,2		
12 30 - 1 00	1,7	4,0	
1 00 - 1 30	2,3		
1h30'	200 g gemahlenes Pferdefleisch		
1h30'- 2h00'	3,2	6,9	23,2
2 00 - 2 30	3,7		
2 30 - 3 00	4,1	8,9	
3 00 - 3 30	4,4		
3 30 - 4 00	4,3	7,8	
4 00 - 4 30	3,5		
4 30 - 5 00	6,4		

Tabelle XIII.

Pawlowhund I, ♀, etwa 11 kg.
7. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach Fleischgabe und gleichzeitige Insulininjektion.

Zeit	Magensaft ccm		Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Injektion
	in 30 Min.	in 60 Min.	
10h00'-10h30'	2,8	5,6	
10 30 -11 00	2,8		
11h10'	200 g gemahlenes Pferdefleisch und 2 Kanincheneinheiten Insulin intravenös (am Bein)		
11h00'-11h30'	4,0	16,0	49,1
11 30 -12 00	12,0		
12 00 -12 30	6,7	14,4	
12 30 - 1 00	7,7		
1 00 - 1 30	9,6	19,7	
1 30 - 2 00	10,1		
2 00 - 2 30	6,0	11,7	
2 30 - 3 00	5,7		
3 00 - 3 30	3,5	7,4	
3 30 - 4 00	3,9		
4 00 - 4 30	3,0	3,8	
4 30 - 5 00	0,8		
5 00 - 5 30	1,5		

Unwirksame Insulin-Dosis!

Tabelle XIV.

Pawlowhund II, ♀, etwa 12 kg.
4. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach Spinatsekretinapplizierung.

Zeit	Magensaft ccm		Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Injektion
	in 30 Min.	in 60 Min.	
10h00'-10h30'	0,1		
10 30 -11 00	0,1	0,7	
11 00 -11 30	0,6		
11h30'	3,2 ccm (= 2,5 g Blättertrockensubstanz) Spinatsekretin subkutan		
11h30'-12h00'	0,2	1,3	8,0
12 00 -12 30	1,1		
12 30 - 1 00	4,7	5,8	
1 00 - 1 30	1,1		
1 30 - 2 00	0,6	0,9	
2 00 - 2 30	0,3		
2 30 - 3 00	0,1	0,2	
3 00 - 3 30	0,1		
3 30 - 4 00	0,1	0,2	
4 00 - 4 30	0,1		

Dieser Hund sezerniert schon von Anfang an sehr schwach.

Tabelle XV.

Pawlowhund II, ♀, etwa 12 kg.
2. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach gleichzeitiger Spinatsekretin- und Insulininjektion.

Zeit	Magensaft ccm		Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Injektionen
	in 30 Min.	in 60 Min.	
10h00'-10h30'	0,3		
10 30 -11 00	0,4	0,6	
11 00 -11 30	0,2		
11 30 -12 00	0,1	0,1	
12 00 -12 30	0,0		
12h40'	3,2 ccm (= 2,5 g Blättertrockensubstanz) Spinatsekretin subkutan u. 2 Kanincheneinheiten Insulin intravenös		
12h30'- 1h00'	0,0	2,3	3,7
1 00 - 1 30	2,3		
1 30 - 2 00	0,9	1,0	
2 00 - 2 30	0,1		
2 30 - 3 00	0,4	0,4	
3 00 - 3 30	0,0		
3 30 - 4 00	0,1	0,1	
4 00 - 4 30	0,0		
4 30 - 5 00	0,1		

Dieser Hund sezerniert schon von Anfang an sehr schwach.

Tabelle XVI.

Magenfistel-Hund IV, ♂, etwa 6 kg. 4. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach Spinatsekretinapplizierung.

Zeit	Magensaft ccm in 30 Min.	Magensaft ccm in 60 Min.	Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Injektion
8h00'- 8h30'	1,8	4,8	
8 30 - 9 00	3,0		
9h00'	3,2 ccm (= 2,5 g Blättertrockensubstanz) Spinatsekretin subkutan		
9h00'- 9h30'	16,5	28,5	37,6
9 30 -10 00	12,0		
10 00 -10 30	2,7	5,0	
10 30 -11 00	2,3		
11 00 -11 30	2,0	4,1	
11 30 -12 00	2,1		

Tabelle XVII.

Magenfistel-Hund IV, ♂, etwa 6 kg. 6. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach gleichzeitiger Spinatsekretin- und Insulininjektion.

Zeit	Magensaft ccm in 30 Min.	Magensaft ccm in 60 Min.	Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Injektionen
10h00'-10h30'	1,1	1,8	
10 30 -11 00	0,7		
11 00 -11 30	2,0	4,6	
11 30 -12 00	2,6		
12 00 -12 30	1,0	2,1	
12 30 - 1 00	1,1		
1h05'	3,2 ccm (= 2,5 g Blättertrockensubstanz) Spinatsekretin subkutan u. 2 Kanincheneinheiten Insulin intravenös		
1h00'- 1h30'	1,9	5,2	22,4
1 30 - 2 00	3,3		
2 00 - 2 30	5,1	9,2	
2 30 - 3 00	4,1		
3 00 - 3 30	4,5	8,0	
3 30 - 4 00	3,5		

Tabelle XVIII.

Pawlowhund I, ♀, etwa 11 kg. Verhalten der Magensaftsekretion nach Spinatsekretininjektion.

Zeit	Magensaft ccm in 30 Min.	Magensaft ccm in 60 Min.
1h00'- 1h30'	1,3	2,2
1 30 - 2 00	0,9	
2h00'	3,2 ccm (= 2,5 g Blättertrockensubstanz) Spinatsekretin subkutan	
2h00'- 2h30'	17,2	46,9
2 30 - 3 00	29,7	
3 00 - 3 30	10,5	12,4
3 30 - 4 00	1,9	
4 00 - 4 30	0,7	1,5
4 30 - 5 00	0,8	

Durchschnitt von 3 Versuchen.

Tabelle XIX.

Pawlowhund I, ♀, etwa 11 kg. Verhalten der Magensaftsekretion nach sich folgender Spinatsekretin- und Insulininjektion.

Zeit	Magensaft ccm in 30 Min.	Magensaft ccm in 60 Min.
1h00'- 1h30'	2,0	3,8
1 30 - 2 00	1,8	
2h00'	3,2 ccm (= 2,5 g Blättertrockensubstanz) Spinatsekretin subkutan	
2h00'- 2h30'	13,9	41,4
2 30 - 3 00	27,5	
3h00'	3 Kanincheneinheiten Insulin intravenös	
3h00'- 3h30'	11,0	12,3
3 30 - 4 00	1,3	
4 00 - 4 30	1,6	2,5
4 30 - 5 00	0,9	
5 00 - 5 30	0,6	0,9
5 30 - 6 00	0,3	

Durchschnitt von 2 Versuchen.

Tabelle XVIII gibt die Durchschnittswerte von zwei Versuchen, bei denen das Insulin 1 Stunde nach der Spinatsekretininjektion gegeben wurde. Die Resultate von diesen Versuchen sind mit denjenigen von

den Versuchen, bei denen nur Spinatsekretin appliziert wurde, zu vergleichen (Tabelle XIX). Bei einer solchen Versuchsanordnung zeigt das Insulin keine Wirkung.

In eklatanter Weise aber hat sich die Insulinhemmung bei den folgenden Versuchen gezeigt. Bei diesen Versuchen haben wir gleich, nachdem wir eine reine Sekretinkurve bekommen hatten, dem Versuchstiere aufs neue jetzt gleichzeitig die gleiche Menge Sekretin und außerdem Insulin gegeben (s. Tabellen XX und XXI und Abb. 3). Diese Versuche sind auch mit demjenigen, den Tabelle XXII gibt, bei dem wir, nachdem wir eine Sekretinkurve bekommen hatten, um eine zweite solche Kurve zu bekommen, dem Versuchstiere noch einmal dieselbe Sekretinmenge injiziert hatten, zu vergleichen.

Tabelle XX.

Pawlowhund I, ♀, etwa 11 kg.
2. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach Spinatsekretin- bzw. nach gleichzeitiger Spinatsekretin- und Insulininjektion.

Zeit	Magensaft ccm in 30 Min.	Magensaft ccm in 60 Min.	Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Injektionen
9h30'-10h00'	1,6	3,5	
10 00-10 30	1,9		
10h30'	3,2 ccm (= 2,5 g Blättertrockensubst.) Spinatsekretin subkutan		
10h30'-11h00'	16,7	39,5	60,9
11 00-11 30	22,8		
11 30-12 00	15,2	17,7	
12 00-12 30	2,5		
12 30- 1 00	1,8	3,7	
1 00- 1 30	1,9		
1 35'	3,2 ccm (= 2,5 g Blättertrockensubst.) Spinatsekretin subkutan und 3 Kanincheneinheiten Insulin intravenös		
1h30'- 2h00'	0,5	3,4	17,5
2 00- 2 30	2,9		
2 30- 3 00	9,1	11,1	
3 00- 3 30	2,0		
3 30- 4 00	1,8	3,0	
4 00- 4 30	1,2		
4 30- 5 00	0,8		

Tabelle XXI.

Pawlowhund III, ♂, etwa 12 kg.
7. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach Spinatsekretin- bzw. nach gleichzeitiger Spinatsekretin- und Insulininjektion.

Zeit	Magensaft ccm in 30 Min.	Magensaft ccm in 60 Min.	Ges.-Magensaftmenge in den ersten $2^1/_2$ Std. nach d. Injektionen
9h00'- 9h30'	3,3	6,9	
9 30-10 00	3,6		
10 00-10 30	5,0	10,2	
10 30-11 00	5,2		
11 00-11 30	1,2	4,2	
11 30-12 00	3,0		
12 00-12 30	2,4	6,5	
12 30- 1 00	4,1		
1h15'	3,2 ccm (= 2,5 g Blättertrockensubst.) Spinatsekretin subkutan		
1h00'- 1h30'	6,3	25,5	33,2
1 30- 2 00	19,2		
2 00- 2 30	4,9	6,1	
2 30- 3 00	1,2		
3 00- 3 30	1,6		
3h45'	3,2 ccm (= 2,5 g Blättertrockensubstanz) Spinatsekretin subkutan und 3 Kanincheneinheiten Insulin intravenös		
3h30'- 4h00'	0,1	2,5	12,8
4 00- 4 30	2,4		
4 30- 5 00	8,2	9,5	
5 00- 5 30	1,3		
5 30- 6 00	0,8		

Tabelle XXII.

Pawlowhunde I, ♀, und III, ♂. Verhalten der Magensaftsekretion nach Spinatsekretininjektionen — zwei Versuche hintereinander.

Zeit	Magensaft in ccm		Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Stunden nach den Injektionen
	in 30 Min.	in 60 Min.	
1h00'—1h30'	0,4		
1 30 —2 00	1,2	2,3	
2 00 —2 30	1,1		
2h30'	3,2 ccm (= 2,5 g Blättertrockensubstanz) Spinatsekretin subkutan		
2h30'—3h00'	12,1	29,7	39,9
3 00 —3 30	17,6		
3 30 —4 00	6,7	8,8	
4 00 —4 30	2,1		
4 30 —5 00	0,7	1,4	
5 00 —5 30	0,7		
5h30'	3,2 ccm (= 2,5 g Blättertrockensubstanz) Spinatsekretin subkutan		
5h30'—6h00'	7,2	23,9	31,6
6 00 —6 30	16,7		
6 30 —7 00	5,8	6,9	
7 00 —7 30	1,1		
7 30 —8 00	0,5	0,8	
8 00 —8 30	0,3		

Durchschnitt von drei Versuchen.

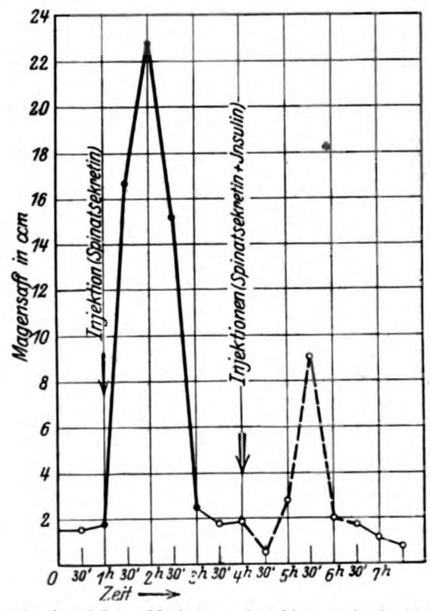


Abb. 3. Pawlowhund I ♀. Verhalten der Magensaftsekretion nach nur Spinatsekretininjektion (ausgezogene Linie), bzw. nach Spinatsekretion — + Insulininjektion (gestrichelte Linie).

D. Versuche mit Pilocarpin und Insulin.

Die hierher gehörigen Versuche wurden in derselben Weise wie die Fleischversuche angestellt. Auch bei den Pilocarpinversuchen konnten wir durch eine genügende Dosis Insulin (3 Kanincheneinheiten) eine beträchtliche Hemmung der Magensaftsekretion konstatieren. Dies ist aus den folgenden Tabellen (XXIII bis XXVI) und Abb. 4 zu ersehen.

Tabelle XXIII.
Pawlowhund II, ♀, etwa 12 kg.
8. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach Pilocarpinapplizierung.

Zeit	Magensaft ccm		Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Injektion
	in 30 Min.	in 60 Min.	
10h30′-11h00′	0,4		
11 00-11 30	1,3	2,3	
11 30-12 00	1,0		
12h05′	0,5 ccm 5proz. Pilocarpinlösung subkutan		
12h00′-12h30′	2,4	5,8	11,5
12 30- 1 00	3,4		
1 00- 1 30	1,7	3,0	
1 30- 2 00	1,3		
2 00- 2 30	2,2	2,7	
2 30- 3 00	0,5		
3 00- 3 30	0,8	1,2	
3 30- 4 00	0,4		

Tabelle XXIV.
Pawlowhund II, ♀, etwa 12 kg.
9. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach gleichzeitiger Pilocarpin- und Insulininjektion.

Zeit	Magensaft ccm		Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Injektionen
	in 30 Min.	in 60 Min.	
10h30′-11h00′	0,1		
11 00-11 30	0,1	0,2	
11 30-12 00	0,1		
12 00-12 30	0,3	0,4	
12 30- 1 00	0,1		
1h15′	0,5 ccm 5proz. Pilocarpinlösung subkutan und 3 Kanincheneinheiten Insulin intravenös (am Bein)		
1h00′- 1h30′	0,0	1,6	3,9
1 30- 2 00	1,6		
2 00- 2 30	0,2	1,4	
2 30- 3 00	1,2		
3 00- 3 30	0,4	0,9	
3 30- 4 00	0,5		

Bei einem dritten gleich angestellten Versuch, bei dem wir aber nur 2 Kanincheneinheiten Insulin eingespritzt hatten, zeigte das Insulin gar keine hemmende Wirkung (s. Tabellen XXVII und XXVIII).

Wir sehen also, *daß sich durch Insulin konstant eine Hemmung der Magensaftsekretion hervorrufen läßt*. Es ist im gewissen Sinne ein *Antisekretin* für den Magen. Was die Beeinflussung der äußeren Sekretion der anderen Verdauungsdrüsen durch Insulin betrifft, so hat sich z. B. eine Identität dieser beiden Hormone (Insulin und Sekretin) auf die äußere Sekretion der Leber gezeigt, wie das zuerst von *Brugsch* und *Horsters*[1]), sowie auch einem von uns [*Dobreff*[2])] gefunden wurde.

Wenn man jetzt bezüglich der Sekretion des Magens eine Wirkung des Insulins vermittelst der Nerven annehmen will, so bleibt uns nur übrig, an die Lähmung des excitosekretorisch wirkenden Magenvagus oder der excitosekretorisch wirkenden Sympathicusfasern aus

[1]) ***Brugsch*** und ***Horsters***, Med. Klinik. Nr. 20, 1924.
[2]) *Dobreff*, diese Zeitschr. **154**, 364, 1924.

Tabelle XXV.
Pawlowhund III, ♂, etwa 12 kg.
10. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach Pilocarpinapplizierung.

Zeit	Magensaft ccm in 30 Min.	Magensaft ccm in 60 Min.	Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Injektion
10h30′-11h00′	1,9	4,4	
11 00-11 30	2,5		
11 30-12 00	1,0	2,7	
12 00-12 30	1,7		
12h30′	0,5 ccm 5 proz. Pilocarpinlösung subkutan		
12h30′- 1h00′	8,1	13,1	22,0
1 00- 1 30	5,0		
1 30- 2 00	5,2	6,5	
2 00- 2 30	1,3		
2 30- 3 00	1,1	2,4	
3 00- 3 30	1,3		

Tabelle XXVI.
Pawlowhund III, ♂, etwa 12 kg.
12. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach gleichzeitiger Pilocarpin- und Insulininjektion.

Zeit	Magensaft ccm in 30 Min.	Magensaft ccm in 60 Min.	Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Injektionen
9h30′-10h00′	3,2	6,0	
10 00-10 30	2,8		
10 30-11 00	0,9	3,7	
11 00-11 30	2,8		
11h30′	0,5 ccm 5 proz. Pilocarpinlösung subkutan und 3 Kanincheneinheiten Insulin intravenös (am Bein)		
11h30′-12h00′	7,0	10,9	16,2
12 00-12 30	3,9		
12 30- 1 00	1,5	3,0	
1 00- 1 30	1,5		
1 30- 2 00	1,5	2,3	
2 00- 2 30	0,8		

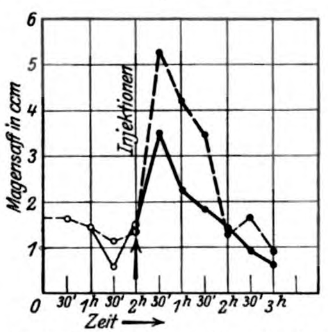


Abb. 4. Pawlowhund II ♀ und III ♂. Verhalten der Magensaftsekretion nach Pilocarpin- (○— — —○), bzw. nach Pilocarpin- und Insulininjektion (○———○). Durchschnittskurven aus je 2 Versuchen.

dem Ganglion coeliacum oder an die Reizung des depressosekretorisch wirkenden Sympathicus zu denken. Dagegen sprechen teilweise die oben angeführten Versuche am Herzen, sowie auch Beobachtungen an der Gallensekretion nach Insulininjektion. Es könnte sich aber vielleicht auch um gar keine Nervenwirkung, sondern um eine unmittelbare Beeinflussung der Drüsenzellen durch das Insulin handeln oder eine Nervenwirkung könnte gleichzeitig vorhanden sein.

Wenn wir aber gleichzeitig die hemmende Wirkung des Insulins auf die Magensekretion einerseits mit seiner Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel andererseits vergleichen, so erkennen wir, daß nach den Insulineinspritzungen *die Hyperglykämie zu sinken anfängt, wenn*

Tabelle XXVII.
Pawlowhund I, ♀, etwa 11 kg.
14. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach Pilocarpinapplizierung.

Zeit	Magensaft ccm in 30 Min.	Magensaft ccm in 60 Min.	Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Injektion
11h30'-12h00'	1,6	3,2	
12 00-12 30	1,6		
12h30'	0,5 ccm 5 proz. Pilocarpinlösung subkutan		
12h30'- 1h00'	14,1	20,1	31,4
1 00 - 1 30	6,0		
1 30 - 2 00	3,6	6,7	
2 00 - 2 30	3,1		
2 30 - 3 00	2,8	4,6	
3 00 - 3 30	1,8		
3 30 - 4 00	1,9	3,2	
4 00 - 4 30	1,3		
4 30 - 5 00	1,4	2,4	
5 00 - 5 30	1,0		

Tabelle XXVIII.
Pawlowhund I, ♀, etwa 11 kg.
15. IV. 1924. Verhalten der Magensaftsekretion nach gleichzeitiger Pilocarpin- und Insulininjektion.

Zeit	Magensaft ccm in 30 Min.	Magensaft ccm in 60 Min.	Ges.-Magensaftmenge in den ersten 3 Std. nach d. Injektionen
10h30'-11h00'	1,2		
11 00-11 30	1,7	3,1	
11 30-12 00	1,4		
12h10'	0,5 ccm 5 proz. Pilocarpinlösung subkutan und 2 Kanincheneinheiten Insulin intravenös (am Bein)		
12h00'-12h30'	8,4	19,1	34,5
12 30 - 1 00	10,7		
1 00 - 1 30	6,8	10,8	
1 30 - 2 00	4,0		
2 00 - 2 30	2,6	4,6	
2 30 - 3 00	2,0		
3 00 - 3 30	1,1	2,3	
3 30 - 4 00	1,2		

Unwirksame Insulindosis!

die sekretionshemmende Wirkung schon vorbei ist. Es scheint also, daß die Wirkung des Insulins auf die Magensaftsekretion unabhängig ist von seiner physiologischen Rolle als Regulator des Zuckerstoffwechsels, möglicherweise sind es auch zwei verschiedene Stoffe, die in dem Insulinpräparat vorhanden sind, von denen der eine die Magensekretion hemmt, der andere die Zuckerneubildung fördert.

Solange das Insulin nicht rein dargestellt ist, wird diese Frage kaum zu entscheiden sein.

Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung des Insulins auf die äußere Sekretion der Verdauungsdrüsen.

II. Mitteilung:

Über den Einfluß des Insulins auf die Gallenabsonderungsfähigkeit.

Von

Minko Dobreff (Bulgarien).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 25. November 1924.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In der weiteren Verfolgung der mit *Collazo* zusammen begonnenen Arbeiten[1]) über den Einfluß des Insulins auf die äußere Sekretion der Verdauungsdrüsen habe ich Versuche auf die Gallenabsonderung angestellt. Über einen Einfluß des Insulins auf die äußere Sekretion der Leber besteht eine Beobachtung von *Brugsch* und *Horsters*[2]), die am Hunde eine Vermehrung der Gallensekretion nach Insulininjektion gesehen haben.

Die Versuche wurden am Gallenblasenfistelhund ausgeführt.

Die Versuchsanordnung war folgende: Der Versuchshund, der bei ligiertem und durchschnittenem Ductus choledochus eine permanente Gallenblasenkanüle trug, bekam täglich einmal zur gleichen Zeit das gleiche Futter. Die Nahrung bestand aus einer dicken Suppe mit Einlagen von Kartoffeln, Gemüse und Fleisch. Die Versuche wurden so angestellt, daß der Hund immer 15 bis 20 Stunden vor den Versuchen nüchtern gehalten wurde. Die eigentlichen Versuche habe ich immer zuerst mit einer sich über eine bestimmte Zeit erstreckenden

---

[1]) *Collazo* und *Dobreff*, Klin. Wochenschr. **27**, 1924; diese Zeitschr. **154**, 349, 1924; Münch. med. Wochenschr. Nr. 48, 1924.

[2]) *Brugsch* und *Horsters*, Med. Klinik **20**, 1924.

Kontrollbeobachtung angefangen. Die Kontrollbeobachtung bestand in einer kontinuierlichen Verfolgung der normalen Absonderung der Galle, bevor das nüchterne Versuchstier das Arzneimittel erhielt. So konnte man leicht die Veränderungen in der Sekretion nach der Einverleibung des betreffenden Mittels mit dem normalen Verlauf der Absonderung vor der Injektion vergleichen. Die abfließende Galle aus der Blase wurde in 15-Minuten-Perioden gemessen. Die abgesonderten Gallenmengen vor und nach der Injektion von Insulin wurden für sich getrennt gesammelt und dann die Trockensubstanz von diesen beiden Gallenproben bestimmt. Bei den Versuchen mit Insulininjektion allein wurde die Trockensubstanz auf Volumen sowie auch auf Gewicht berechnet; bei den anderen Versuchen mit Insulininjektion und gleichzeitiger Gabe anderer Mittel nur auf Volumen bestimmt. Alle Insulininjektionen wurden intravenös am Beine ausgeführt. Bei der zweiten Serie von Versuchen, bei denen ich die Insulinwirkung im Zusammenhang mit derjenigen von anderen Arzneimitteln prüfte, wurden diese per os, subkutan oder intravenös gegeben. Weitere Einzelheiten sind aus den Versuchsprotokollen zu ersehen. Das bei den Versuchen gebrauchte Insulin war uns von *Casimir Funk* freundlichst zur Verfügung gestellt worden.

Die Ergebnisse meiner Versuche lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. *Wird während der nüchternen Gallensekretion Insulin injiziert, so folgt noch in den ersten 15 Minuten (bzw. 30 Minuten) eine obligatorische, ganz beträchtlich gesteigerte Gallenabsonderung aus der Blase*; der Maximalpunkt wird in 30 bis 60 Minuten erreicht; dann beobachten wir weiter ein allmähliches Absinken, das in 1½ bis 2 Stunden das Niveau der Sekretion, das sie vor der Insulininjektion hatte, erreicht.

2. Die Hemmung der Gallensekretion nach peroraler Kochsalzlösunggabe wird durch Insulin teilweise abgeschwächt.

3. Da motorische Effekte bei den Adrenalin- und Acetylcholinversuchen intervenieren und so schon die sekretorischen Effekte dieser Arzneimittel verdunkeln, ist eine Deutung meiner überdies auch vielfach divergierenden Versuchsresultate der Versuche mit kombinierter Injektion von Insulin und diesen Substanzen kaum zu geben.

Wir können also das Insulin in die Gruppe der *Cholagoga* einstellen.

1. Reine Insulinversuche.

Wenn man einem Gallenblasenfistelhunde, nachdem man bei ihm die im Anschluß an eine mehrere Stunden voraufgegangene Fütterung abfließende Gallenmenge zur Kontrolle verfolgt hat, eine Insulininjektion von 3 Kanincheneinheiten intravenös gibt, so zeigt sich noch in der ersten halben Stunde nach der Injektion eine intensive Steigerung der Gallensekretion (s. Tabelle I, II, III). Dabei nimmt der Prozentgehalt der Galle

an Trockensubstanz ab. Bei einem Versuch war sogar die Steigerung der Gallenabsonderung am Maximalpunkte im Vergleich mit dem mittleren Wert der Sekretion vor der Injizierung des Insulins um etwa 2000 Proz. gestiegen (Tabelle III).

Die sich nach der Insulininjektion einstellende Gallensekretionssteigerung ist vorübergehender Natur. Nachdem die vermehrte Gallensekretion ihr Maximum erreicht hat, beginnt ein allmähliches Absinken, das etwa 1½ bis 2 Stunden nach der Injektion wieder das Niveau erreicht, das die Sekretion vor der Applizierung des Insulins gehabt hat. Darüber mögen die folgenden Tabellen I, II, III und Abb. 1 belehren.

Tabelle I.

Gallenblasenfistelhund, ♀, etwa 11 kg, 16. Juli 1924.

Zeit in 15-Min.-Perioden	Gallenmenge in ccm			Trockensubstanz der Galle vor und nach der Injektion	
	in 15 Min.	in 30 Min.	Mittelwert vor und nach der Injektion	in 5 ccm	in 100 g
Versuch mit 3 Kanincheneinheiten Insulin.					
1.	1,0				
2.	1,2	2,2	1,06	0,2114	4,2884
3.	1,0				
Intravenöse Insulininjektion (am Bein) = 3 Kanincheneinheiten.					
4.	0,8	3,2			
5.	**2,4**				
6.	2,3	3,6			
7.	1,3		1,60	0,1472	2,9748
8.	1,6	3,1			
9.	1,5				
10.	1,3				

(In den Tabellen I, II, III und IV sind die Maximalwerte der sezernierten Galle fett gedruckt.)

Tabelle II.

Gallenblasenfistelhund, ♀, etwa 11 kg, 17. Juli 1924.

Zeit in 15-Min.-Perioden	Gallenmenge in ccm			Trockensubstanz der Galle vor und nach der Injektion	
	in 15 Min.	in 30 Min.	Mittelwert vor und nach der Injektion	in 5 ccm	in 100 g
Versuch mit 3 Kanincheneinheiten Insulin.					
1.	1,0				
2.	1,5	2,0	1,0	0,1980	3,9959
3.	0,5				
Intravenöse Insulininjektion (am Bein) = 3 Kanincheneinheiten.					
4.	1,6	3,4			
5.	1,8				
6.	**2,0**	3,1			
7.	1,1		1,30	0,1634	3,3534
8.	1,8	2,7			
9.	0,9				
10.	0,7				

Ich konnte eine ausgesprochene Steigerung der Gallenabsonderung, und zwar der Menge, wie des prozentigen Trockensubstanzgehalts nach Injektion von nur 1 Kanincheneinheit Insulin beobachten, wie das aus der Tabelle IV zu ersehen ist. Es ist aber interessant, zu bemerken, daß bei unseren Insulinversuchen (*Collazo* und *Dobreff*, l. c.) an nüchternen Pawlowhunden manchmal sogar die Dosis von 2 Kanincheneinheiten sich unwirksam gezeigt hat.

Tabelle III.

Gallenblasenfistelhund, ♀, etwa 11 kg, 29. Juli 1924.

Zeit in 15-Min.-Perioden	Gallenmenge in ccm			Trockensubstanz der Galle vor und nach der Injektion	
	in 15 Min.	in 30 Min.	Mittelwert vor und nach der Injektion	in 5 ccm	in 100 g
	Versuch mit 3 Kanincheneinheiten Insulin.				
1.	0,5				
2.	0,5	1,1			
3.	0,6		0,40	0,2096	4,3096
4.	0,2	0,4			
5.	0,2				
	Intravenöse Insulininjektion (am Bein) = 3 Kanincheneinheiten.				
6.	0,9	2,4			
7.	1,5				
8.	2,2	9,9			
9.	7,7				
10.	6,1	8,1			
11.	2,0		2,41	0,1655	3,4195
12.	1,7	3,4			
13.	1,7				
14.	0,9	1,4			
15.	0,5				
16.	1,4				

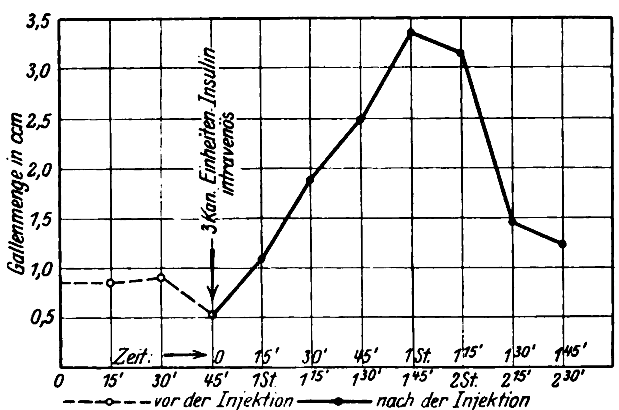


Abb. 1. Gallenblasenfistelhund ♀ etwa 11 kg. Verhalten der nüchternen Gallensekretion nach intravenöser Insulininjektion. Die Abbildung stellt die Mittelwerte aus den Tabellen I, II und III dar.

Tabelle IV. Gallenblasenfistelhund, ♀, etwa 11 kg, 7. August 1924.

Zeit in 15-Min.-Perioden	Gallenmenge in ccm			Trockensubstanz der Galle vor und nach der Injektion	
	in 15 Min.	in 30 Min.	Mittelwert vor und nach der Injektion	in 5 ccm	in 100 g
	Versuch mit 1 Kanincheneinheit Insulin.				
1.	0,8	1,1	0,40	0,1505	3,0674
2.	0,3				
3.	0,3	0,5			
4.	0,2				
	Intravenöse Insulininjektion (am Bein) = 1 Kanincheneinheit.				
5.	0,8	4,9	1,74	0,1851	3,7048
6.	4,1				
7.	3,7	6,0			
8.	2,3				
9.	1,4	2,5			
10.	1,1				
11.	0,9	2,0			
12.	1,1				
13.	0,9	2,0			
14.	1,1				

Tabelle V. Gallenblasenfistelhund, ♀, etwa 11 kg, 28. Juli 1924.

Zeit in 15-Min.-Perioden	Gallenmenge in ccm			Trockensubstanz der Galle in 5 ccm	Bemerkungen
	in je 15 Min.	in je 30 Min.	Mittelwert für 15-Min.-Periode		
	Kontrollversuch mit Kochsalzlösung.				
1.	1,4	1,5	0,98		
2.	1,0				
3.	0,5				
4.	0,5	2,0			
5.	1,5				
	150 ccm 5 proz. Kochsalzlösung (7,5 g NaCl) per os (Magensonde).				
6.	1,3	2,1	1,05	0,2307	15 Minuten nach der Kochsalzlösunggabe etwas erbrochen.
7.	0,8				
8.	1,3	2,2			
9.	0,9				
10.	1,1	2,0			
11.	0,9				
	150 ccm 10 proz. Kochsalzlösung (15 g NaCl) per os (Magensonde).				
12.	1,3	2,5	0,70	0,2411	Gleich nach der Kochsalzlösunggabe etwa 25 ccm erbrochen.
13.	1,2				
14.	1,1	2,1			
15.	1,0				
16.	0,8	1,3			
17.	0,5				
18.	0,5	1,0			
19.	0,5				
20.	0,3	0,7			
21.	0,4				
22.	0,6	0,9			
23.	0,3				

Tabelle VI.

Gallenblasenfistelhund, ♀, etwa 11 kg, 30. Juli 1924.

Zeit in 15-Min.-Perioden	Gallenmenge in ccm			Trockensubstanz der Galle in 5 ccm	Bemerkungen
	in je 15 Min.	in je 30 Min.	Mittelwert für 15-Min.-Periode		
Versuch mit Kochsalzlösung und Insulin.					
1.	1,7				
2.	1,9	3,5			
3.	1,6				
4.	1,4	2,9	1,74	0,1600	
5.	1,5				
6.	3,0	4,1			
7.	1,1				
150 ccm 10 proz. Kochsalzlösung (15 g NaCl) per os (Magensonde).					
8.	1,6	4,6			15 Minuten nach der Kochsalzlösungsgabe erbrochen.
9.	3,0				
10.	2,6	4,9	2,40	0,1986	
11.	2,3				
12.	2,5				
Intravenöse Insulininjektion (am Bein) = 3 Kanincheneinheiten.					
13.	1,5	2,5			
14.	1,0				
15.	0,7	1,8			
16.	1,1		1,72	0,1725	
17.	1,5	4,0			
18.	2,5				
19.	3,3	5,5			
20.	2,2				

Die Galle der starken sich prompt nach der Insulininjektion einstellenden Gallensekretionssteigerung war bei den Versuchen mit 3 Kanincheneinheiten im Vergleich zu der vor der Injektion etwas weniger konzentriert. Wenn man aber die absoluten Mengen des Trockenrückstandes in der Insulingalle (abgesonderte Galle nach der Insulininjektion) berechnet, so ist leicht zu ersehen, daß auch nach der Injektion absolut eine leichte Erhöhung in der Absonderung von Trockensubstanz eingetreten ist. Bei dem Versuch mit 1 Kanincheneinheit Insulin war die Insulingalle sogar auf Prozent berechnet konzentrierter als die andere Galle.

Wir haben es also in unserem Falle nicht nur mit einer Wassersekretionssteigerung — Verdünnung der abfließenden Galle — zu tun, sondern parallel mit ihr auch mit einer absolut vermehrten Ausscheidung fester Bestandteile.

2. Kombinierte Versuche.

Die zweite Serie meiner Versuche betraf die Frage, ob nicht durch Insulin eine Beeinflussung der Wirkung einiger die Gallenausscheidung hemmender Pharmaka ausgeübt werden kann.

A. Kochsalz + Insulinversuche.

Die Kochsalzlösung ruft in bestimmter Konzentration nach der peroralen Gabe eine deutliche Hemmung der Gallensekretion hervor

Tabelle VII. Gallenblasenfistelhund, ♀, etwa 11 kg, 31. Juli 1924.

Zeit in 15-Min.-Perioden	Gallenmenge in ccm			Trockensubstanz der Galle in 5 ccm	Bemerkungen
	in je 15 Min.	in je 30 Min.	Mittelwert für 15-Min.-Periode		
	Versuch mit Kochsalzlösung und Insulin.				
1.	1,1	3,0	1,90	0,1673	
2.	1,9				
3.	2,5	4,6			
4.	2,1				
	150 ccm 10 proz. Kochsalzlösung (15 g NaCl) per os (Magensonde).				
5.	3,2	5,4	1,64		15 Minuten nach der Kochsalzlösunggabe erbrochen.
6.	2,2				
7.	2,0	2,2			
8.	0,2				
9.	0,6				
	Intravenöse Insulininjektion (am Bein) = 3 Kanincheneinheiten.				
10.	1,1	2,5	1,24	0,2215	
11.	1,4				
12.	1,2	2,2			
13.	1,0				
14.	1,2	1,9			
15.	0,7				
16.	1,8	3,3			
17.	1,5				

[*Heianzan*[1])]. Die hierher gehörigen Versuche wurden so angestellt, daß zuerst von dem nüchternem Versuchstier zur Kontrolle eine reine Kochsalzlösungskurve gemacht wurde, und in den nächsten Tagen Kochsalz in Kombination mit Insulin appliziert wurde. Bei den Kombinationsversuchen wurde, wie allgemein üblich, zunächst die nüchterne Gallensekretion einige Zeit periodisch gemessen; dann wurde die Kochsalzlösung per os gegeben, um die Gallensekretion zu hemmen. Diese Hemmung tritt erst etwa 1 Stunde nach der Kochsalzgabe auf; in der ersten Stunde ist eine leichte Steigerung der Sekretion vorhanden. Ich habe also die Insulininjektionen deshalb am Ende der ersten Stunde nach der Kochsalzgabe gemacht (Tabelle V, VI, VII).

Das *Resultat* dieser Versuche war eine sehr schwache Beeinflussung im Sinne einer Steigerung auf die sich nach der peroralen Gabe von Kochsalzlösung einstellende gehemmte Gallensekretion.

B. Suprarenin + Insulinversuche.

Die Anordnung bei diesen Versuchen wurde so gewählt, daß der nüchterne Versuchshund, nachdem bei ihm einige Zeit die normale Gallensekretion verfolgt worden war, Suprarenin bzw. Suprarenin + Insulin bekam. Dann wurde der Verlauf der Sekretionskurve nach der Injektion weiter verfolgt, und wenn die Wirkung der gegebenen Mittel schon vorbei war, wurde an demselben Tiere ein zweiter Versuch angestellt. Die Versuche wurden in verschiedenen Variationen gemacht, wie das aus den Tabellen (VIII bis XII) zu ersehen ist, gestellt.

[1]) *Heianzan*, nach dem Manuskript zitiert.

Wie wir schon wissen [*Watanabe*[1])], vermindert oder vermehrt je nach der Dosierung das Suprarenin den Gallenabfluß aus der Blasenfistel. Wird während des Verlaufs der Wirkung einer solchen Suprarenininjektion Insulin gegeben, so bekommt man eine fakultative Parierung der gallenausscheidungshemmenden Suprareninwirkung.

Tabelle VIII.

Gallenblasenfistelhund, ♀, etwa 11 kg, 11. August 1924.

Zeit in 15-Min.-Perioden	Gallenmenge in ccm			Trockensubstanz der Galle in 5 ccm
	in je 15 Min.	in je 30 Min.	Mittelwert für 15-Min.-Periode	
	Versuche mit Adrenalin.			
1.	0,6			
2.	0,6	1,8		
3.	1,2		0,60	0,1828
4.	0,7	1,6		
5.	0,9			
	0,5 ccm subkutane Adrenalininjektion (1: 1000).			
6.	2,5	7,9		
7.	5,4			
8.	4,1	7,4		
9.	3,3			
10.	1,1	2,3	2,27	0,1601
11.	1,2			
12.	1,2	1,8		
13.	0,6			
14.	1,1			
	0,5 ccm subkutane Adrenalininjektion (1: 1000).			
15.	1,3	1,9		
16.	0,6			
17.	0,7	1,4		
18.	0,7			
19.	0,6	1,3	0,95	0,2781
20.	0,7			
21.	1,0	2,3		
22.	1,3			
23.	1,7			

Tabelle IX.

Gallenblasenfistelhund, ♀, etwa 11 kg, 4. August 1924.

Zeit in 15-Min.-Perioden	Gallenmenge in ccm			Trockensubstanz der Galle in 5 ccm
	in je 15 Min.	in je 30 Min.	Mittelwert für 15-Min.-Periode	
	Versuche mit Adrenalin und Insulin.			
1.	2,0	4,1		
2.	2,1			
3.	1,8	3,6	1,92	0,1822
4.	1,8			

[1]) *Watanabe*, Zeitschr. f. ges. exper. Med. **40**, 1924.

Tabelle IX (Fortsetzung).

Zeit in 15-Min.-Perioden	Gallenmenge in ccm in je 15 Min.	Gallenmenge in ccm in je 30 Min.	Mittelwert für 15-Min.-Periode	Trockensubstanz der Galle in 5 ccm
	0,5 ccm subkutane Adrenalininjektion (1: 1000).			
5.	2,8	4,9		
6.	2,1			
7.	1,3	2,8		
8.	1,5			
9.	1,4	3,0	1,68	0,2033
10.	1,6			
11.	1,9	3,5		
12.	1,6			
13.	1,0			
	Intravenöse Insulininjektion (am Bein) = 3 Kanincheneinheiten.			
14.	1,8	3,0		
15.	1,2			
16.	2,0	3,8	1,65	0,1969
17.	1,8			
18.	1,5	3,1		
19.	1,6			

Tabelle X. Gallenblasenfistelhund, ♀, etwa 11 kg, 2. August 1924.

Zeit in 15-Min.-Perioden	Gallenmenge in ccm in je 15 Min.	Gallenmenge in ccm in je 30 Min.	Mittelwert für 15-Min.-Periode	Trockensubstanz der Galle in 5 ccm
	Versuch mit Adrenalin + Insulin und Kontrollversuch nur mit Adrenalin.			
1.	1,5			
2.	2,1	4,5	2,00	0,1627
3.	2,4			
	0,5 ccm subkutane Adrenalininjektion (1: 1000).			
4.	2,6		2,60	0,1495
	Intravenöse Insulininjektion (am Bein) = 3 Kanincheneinheiten.			
5.	2,6	5,3		
6.	2,7			
7.	2,4	4,0		
8.	1,6			
9.	1,6	3,5	2,04	0,1819
10.	1,9			
11.	2,0	4,0		
12.	2,0			
13.	1,7	3,6		
14.	1,9			
	0,5 ccm subkutane Adrenalininjektion (1: 1000).			
15.	1,7	3,5		
16.	1,8			
17.	1,6	2,6		
18.	1,0			
19.	1,1	2,3	1,48	0,2224
20.	1,2			
21.	1,6	3,1		
22.	1,5			
23.	1,9			

Tabelle XI. Gallenblasenfistelhund, ♀, etwa 11 kg, 5. August 1924.

Zeit in 15-Min.-Perioden	Gallenmenge in ccm			Trockensubstanz der Galle in 5 ccm
	in je 15 Min.	in je 30 Min.	Mittelwert für 15-Min.-Periode	
Versuche mit Adrenalin + Insulin.				
1.	2,3	3,7	1,87	0,1555
2.	1,4			
3.	1,8	3,8		
4.	2,0			
0,5 ccm subkutane Adrenalininjektion (1:1000).				
5.	7,5	8,3	4,15	0,1363
6.	0,8			
Intravenöse Insulininjektion (am Bein) = etwa 1 Kanincheneinheit.				
7.	1,3	4,3	1,92	0,1915
8.	3,0			
9.	2,6	4,2		
10.	1,6			
11.	1,1	2,0		
12.	0,9			
13.	0,7	1,3		
14.	0,6			
15.	0,7	4,5		
16.	3,8			
17.	3,7	6,8		0,1563
18.	3,1			
1,0 ccm subkutane Adrenalininjektion (1:1000).				
19.	3,8		3,80	0,1366
Intravenöse Insulininjektion (am Bein) = 3 Kanincheneinheiten				
20.	1,8	3,4	1,39	0,1926
21.	1,6			
22.	1,3	1,9		
23.	0,6			
24.	0,6	2,1		
25.	1,5			
26.	1,7	3,7		
27.	2,0			

Tabelle XII. Gallenblasenfistelhund, ♀, etwa 11 kg, 6. August 1924.

Zeit in 15-Min.-Perioden	Gallenmenge in ccm			Trockensubstanz der Galle in 5 ccm
	in je 15 Min.	in je 30 Min.	Mittelwert für 15-Min.-Periode	
Versuch mit Adrenalin + Insulin und Kontrollversuch nur mit Adrenalin.				
1.	1,0		1,54	0,1855
2.	1,4	2,7		
3.	1,3			
4.	3,0	4,0		
5.	1,0			
1,0 ccm subkutane Adrenalininjektion (1:1000).				
6.	5,2		5,20	0,1452

Tabelle XII (Fortsetzung).

Zeit in 15-Min.-Perioden	Gallenmenge in ccm in je 15 Min.	in je 30 Min.	Mittelwert für 15-Min.-Periode	Trockensubstanz der Galle in 5 ccm
Intravenöse Insulininjektion (am Bein) = 3 Kanincheneinheiten.				
7.	2,0	3,5	1,73	0,1807
8.	1,5			
9.	2,1	3,7		
10.	1,6			
11.	1,4	2,8		
12.	1,4			
13	1,1	2,3		
14	1,2			
15.	2,1	4,3		0,1695
16.	2,2			
17.	2,4			
1,0 ccm subkutane Adrenalininjektion (1:1000).				
18.	2,7	3,2	1,41	0,2296
19.	0,5			
20.	1,0	2,5		
21.	1,5			
22.	0,4	0,8		
23.	0,4			
24.	2,3	4,3		0,1830
25.	2,0			
26.	1,9			

C. Acetylcholin + Insulinversuche.

Ich verfüge hier nur über einen Versuch. Es scheint nach diesem die obligatorische Verminderung der Gallenausscheidung nach Acetylcholininjektion (*Watanabe*, l. c.) durch eine Kombinierung der Acetylcholingabe mit einer Insulininjektion pariert zu werden. Das ist aus den Tabellen XIII und XIV zu ersehen.

Tabelle XIII. Gallenblasenfistelhund, ♀, etwa 11 kg, 24. August 1924.

Zeit in 15-Min.-Perioden	Gallenmenge in ccm in je 15 Min.	in je 30 Min.	Mittelwert für 15-Min.-Periode	Trockensubstanz der Galle in 5 ccm	Bemerkungen
Versuch mit Acetylcholin.					
1.	1,1	3,9	2,02	0,1603	
2.	2,8				
3.	1,8	4,2			
4.	2,4				
5 mg (0,5 ccm 1 proz. wässerige Lösung) Acetylcholin intravenös (am Bein).					
5.	2,2	2,3	1,54	0,1402	Fast momentan nach der Injektion — Schock. Nach paar Minuten — Erholung.
6.	0,1				
7.	0,0	0,0			
8.	0,0				
9.	0,6	4,4			
10.	3,8				
11.	3,3	5,3			
12.	2,0				
13.	1,7	3,4			
14.	1,7				

Tabelle XIV.

Gallenblasenfistelhund, ♀, etwa 11 kg, 9. August 1924.

Zeit in 15-Min.-Perioden	Gallenmenge in ccm in je 15 Min.	Gallenmenge in ccm in je 30 Min.	Gallenmenge in ccm Mittelwert für 15-Min.-Periode	Trockensubstanz der Galle in 5 ccm	Bemerkungen
Versuch mit Acetylcholin + Insulin.					
1.	2,9	5,9	2,75	0,1659	
2.	3,0				
3.	2,7	5,1			
4.	2,4				
5 mg (0,5 ccm 1 proz. wässerige Lösung) Acetylcholin intravenös (am Bein).					
5.	1,3		1,30	0,1800	Fast momentan nach der Injektion — Schock. Nach paar Minuten — Erholg.
Intravenöse Insulininjektion (am Bein) = 3 Kanincheneinheiten.					
6.	1,8	3,8	2,38	0,1103 (6.–14.)	
7.	2,0				
8.	2,2	2,9			
9.	0,7				
10.	3,5	8,1			
11.	4,6				
12.	4,0	5,8			
13.	1,8				
14.	1,6	3,7			
15.	2,1			0,1310 (15.–16.)	
16.	1,9				
Intravenöse Insulininjektion (am Bein) = 1 Kanincheneinheit.					
17.	2,5	4,2	1,53	0,1515	
18.	1,7				
19.	0,5	1,5			
20.	1,0				
21.	1,5	3,0			
22.	1,5				
23.	2,0				

Der Pilzharnstoff als Ersatzmittel des Asparagins.

Von

Nicolaus N. Iwanoff.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität zu Petersburg-Leningrad.)

(Eingegangen am 26. November 1924.)

Der Zerfall und der Aufbau der Eiweißstoffe im Organismus wird seit längerer Zeit an keimenden Samen erforscht. Innerhalb der Grenzen der Versuchsbedingungen kann man die Samen entweder im Dunkeln keimen lassen, wobei hauptsächlich der Zerfall von Eiweißstoffen stattfindet, oder unter normalen Verhältnissen im Lichte, wobei sich zwei gleichzeitig verlaufende Prozesse abspielen: der des Zerfalls und der der Regeneration. Unter der Einwirkung des Lichtes erscheint als ein Eiweißstoffsynthesen hervorrufender Faktor die Bildung und die Zufuhr von Kohlehydraten, aber im Dunkeln und auch im Lichte gehen die Vorratseiweißstoffe nicht direkt in die Gewebe des keimenden Samens über, sondern es bilden sich zunächst Eiweißabbauprodukte, und zwar Aminosäuren. Aus diesen entstehen dann die Amide der Aminosäuren: Asparagin oder Glutamin. Diese letzte These war einerseits von *W. I. Palladin*[1]) bewiesen worden, indem er zeigte, daß in den Pflanzen der Eiweißabbau ohne Sauerstoff nur bis zu den Aminosäuren verläuft, und daß weitere Prozesse, in deren Verlauf Asparagin auftritt, nur bei Gegenwart von Sauerstoff möglich sind. Andererseits hat *D. N. Prjanischnikow*[2]) bestimmte Beweise geliefert, daß das Asparagin im Endverlauf der Synthese als eine sekundäre Bildung aus Aminosäuren erscheint.

Es zeigte sich, daß die Aminosäuren einer Desaminierung unterworfen werden und daß das bei diesem Prozeß sich bildende Ammoniak als Material zur Synthese des Asparagins dient. *Kinoshita* und *Suzuki* haben gezeigt, daß, wenn man den Pflanzen in Wasserkultur Ammo-

---

[1]) *W. Palladin*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. 1888, S. 205.

[2]) *D. Prjanischnikow*, ebendaselbst 1904; Landwirtsch. Versuchsst. **45**, 265, 1894.

niumsalze gibt, letztere in den Geweben der Pflanze nicht angehäuft, sondern in Asparagin übergeführt werden. Wir verdanken *D. N. Prjanischnikow* und seiner Schule[1]) eine ausführliche Untersuchung der Umwandlung von Ammoniak in Asparagin. Es ist ihnen gelungen, drei Typen von Pflanzen (Weizen, Erbse, Lupine) ausfindig zu machen, welche sich je nach dem verschiedenen Gehalt an Kohlehydraten auch verschiedenartig zu dem von außen eingeführten Ammoniak verhalten, auf dessen Kosten sie wechselnde Mengen Asparagin bilden. In jedem Falle werden die Ammoniumsalze bei höheren Pflanzen unter normalen Verhältnissen niemals angehäuft, sondern stets erfolgt eine Umwandlung in Amide : Asparagin und Glutamin. Diese Amide stellen bei grünen Pflanzen eine Vorratsform des Stickstoffs dar, weil z. B. selbst Keime, die sich normal bei Licht entwickeln, so lange Asparagin enthalten, bis in ihnen genügende Mengen von Kohlehydraten gebildet worden sind, die alsdann die Umwandlung des Asparagins in Eiweißstoffe der jungen Pflanzen fördern.

Anders verhalten sich die Schimmelpilze, besonders Aspergillus niger, der viel Ammoniak bildet und dieses durch Oxalsäure neutralisiert, die sich normal im Mycel vorfindet. Kultiviert man aber den Pilz, wie es *Butkewitsch*[2]) ausführte, in Gegenwart von Kreide, welche die Oxalsäure neutralisiert, so häuft Aspergillus niger unter diesen Verhältnissen kein Ammoniak an und die Eiweißabbauprodukte des Pilzes bleiben auf der Aminosäurestufe stehen. Folglich können die Schimmelpilze Ammoniumsalze bilden; in dieser Hinsicht können die Pilze mit niederen Tieren (Actinia) gleichgestellt werden, welche ihren Stickstoff ebenso in Form von Ammoniumsalzen[3]) ausscheiden.

Diesem Schema der Stickstoffumwandlung fügt sich nicht die Gruppe der höheren Pilze ein, bei denen der Harnstoff entdeckt wurde. Das Auffinden von Harnstoff in Bovisten durch *M. Bamberger* und *A. Landsiedl*[4]), durch *A. Goris*[5]) und seine Schüler in anderen Pilzen und schließlich die Ausarbeitung der schönen quantitativen Methode für die Harnstoffbestimmung durch *Fosse*[6]) gaben mir die Möglichkeit, die Umwandlung des Harnstoffs in verschiedenen Pilzen[7]) zu erforschen.

---

[1]) *Prjanischnikow* und *Schulow*, Journ. f. exper. Agronomie 1910 (russisch).

[2]) *Butkewitsch*, Umwandlung der Eiweißstoffe durch niedere Pilze. Jahrb. f. wiss. Bot. **38**, 194.

[3]) *D. Prjanischnikow*, Asparagin und Harnstoff. Diese Zeitschr. **150**, 407, 1924.

[4]) *M. Bamberger* und *Landsiedl*, Monatsh. f. Chem. **24**, 218, 1903.

[5]) *Goris* und *Mascré*, C. r. **153**, 1082, 1911; *Goris* und *Costy*, C. r. 1922.

[6]) *Fosse*, C. r. 1912—1913; Ann de l'Inst. Pasteur **30**, 1, 1916.

[7]) *N. N. Iwanoff*, Journ. de la Soc. bot. de Russie **2**, 129, 1917; diese Zeitschr. **135**, 1, 1923; **136**, 1, 1923; **136**, 9, 1923; **143**, 62, 1923; **150**, 115, 1924.

Ich benutzte anfänglich (l. c.) Boviste und beobachtete, daß zur Zeit der Sporenbildung in den Fruchtkörpern eine maximale Harnstoffmenge gebildet wird, welche 11,16 Proz., auf Trockengewicht bezogen, erreicht, daß sodann bei weiterem Reifen die Harnstoffmenge sinkt und in den reifen Sporen dieser nicht mehr nachgewiesen werden kann. Während des Reifens findet in den Pilzen ein starker Oxydationsprozeß statt, die Menge des stickstofffreien Materials sinkt beträchtlich, wobei ein großer Verbrauch an Trehalose statthat. So fanden sich in einer unreifen Portion 601,8 mg, und in einer ebensolchen Portion nach der Sporenbildung nur 53,3 mg. Das Verschwinden des Harnstoffs während der erhöhten Atmung und des Verbrauchs von Kohlehydraten gaben mir die Möglichkeit, schon im Jahre 1922 den Harnstoff als Vorratsnahrungsstoff, analog dem Asparagin und Glutamin höherer Pflanzen, zu betrachten. Während des Reifens der Boviste vollzieht sich die große Arbeit der Sporenbildung. Das fertige, zum Aufbau von Eiweißstoffen erforderliche Stickstoffmaterial kann sich zeitweilig in Vorratsform von Harnstoff ablagern, welcher leicht durch die Urease in Ammoniak und Kohlensäure gespalten wird. Die Anhäufung von Vorratsstickstoff kann auch in Gegenwart von Kohlehydraten stattfinden: Man erinnere sich nur, daß die Keimlinge der grünen, bei Licht vegetierenden Pflanzen, die in den Vorratskammern der Samen Kohlehydrate enthalten, trotzdem Asparagin anhäufen, das bei weiterer Entwicklung und Wachstum der Pflanze verschwindet. Es ist mir gelungen, den Vergleich des Harnstoffs mit den Amiden grüner Pflanzen durch Tatsachen zu unterstützen in einer Arbeit (l. c.), worin ich zeigte, daß die Zugabe von Ammoniak entweder in Form von Gas oder von Salzen organischer Säuren zu den Fruchtkörpern von Bovisten eine Steigerung der Harnstoffmenge nach sich zieht. Hieraus ist zu ersehen, daß der Harnstoff, wie auch das Asparagin, aus Ammoniak, das durch Zerfall komplizierter Stickstoffverbindungen entsteht, gebildet wird. Die Folgerichtigkeit der Harnstoffbildung habe ich schon beim Reifen von Champignons verfolgt. Hier konnte man beobachten, wie zur Zeit der Sporenbildung im Fruchtkörper autolytische Prozesse stattfanden, wobei die Eiweißstoffe und wahrscheinlich auch das Chitin gespalten wurden und sich Aminostickstoff bildete, dessen Menge später sank; auf Grund dieses Sinkens stieg die Harnstoffmenge an. In den mittels Chloroform abgetöteten Fruchtkörpern fand ebenfalls eine Autolyse statt, aber dieselbe blieb auf dem Stadium der Aminosäurenbildung stehen, so daß die Harnstoffsynthese hier nicht stattgefunden hat.

Ein interessantes Moment bei der Harnstoffuntersuchung von Champignons war der Umstand, daß die Menge des Harnstoffs während der ganzen Zeit zunimmt und selbst nach dem Reifen der Sporen sich

nicht vermindert. In diesem Jahre (1924) ist es mir gelungen, Sporen von Champignons zu sammeln und sie auf ihren Harnstoffgehalt zu untersuchen. Wie bekannt, bilden sich bei Champignons sehr wenig Sporen im Vergleich zum Gewicht des ganzen Fruchtkörpers. In einem Versuch wurde die Hymenschicht, auf der sich die Sporen befanden, und die Sporen selbst untersucht:

	Trockengewicht g	Harnstoffmenge mg	Harnstoff auf Trockengew. Proz.
Hymenschicht	1,2516	103,2	8,25
Sporen	0,3147	3,51	1,11

Aus diesen Daten ist deutlich zu ersehen, daß in den Champignonsporen der Harnstoff auch verschwindet. Es ist möglich, daß in diesem Versuch die Sporen nicht völlig reif waren; in vollständig reifen könnte vielleicht auch diese kleine hier vorhandene Menge verschwinden.

Alle Prozesse, welche beim Reifen der Fruchtkörper stattfinden, sind dahin gerichtet, die Sporenbildung zu sichern. In den Fällen, wo der größte Teil des Fruchtkörpers in Sporen verwandelt wird, wie das beim Reifen der Boviste geschieht, wird der ganze Stickstoff wie auch der Vorratsharnstoff verbraucht. Eine ganz andere Erscheinung beobachten wir beim Reifen der Fruchtkörper von Champignons, wo für die Sporenbildung nur ein geringer Teil des Harnstoffs des ganzen Fruchtkörpers verwandt wird. Während der Entwicklung in der künstlichen Kultur bringt der Pilz große Mengen Stickstoff heran, der zuerst für den Aufbau des ganzen Fruchtkörpers dient und dann zur Zeit der Reife in die Vorratsform von Harnstoff übergeht. Dieser gelangt aus dem übrigen Teile des Pilzes nach der Hymenschicht und versorgt die Sporen mit genügenden Mengen von Stickstoff. Fast der gesamte Überschuß von Pilzstickstoff geht in Harnstoff über, der im Pilz auch beim Absterben zurückbleibt. Hier haben wir anscheinend einen Fall von großer Harnstoffanhäufung als Abfallsprodukt vor uns. Beträchtliche Bildung von Harnstoff in alternden Champignons geht einher mit der Verminderung und weiterhin mit dem vollständigen Verschwinden von Kohlehydraten in den Pilzen; in derartigen Fällen gelingt die Reaktion von *Fehling* niemals. Ein hoher Stickstoffgehalt in Pilzen, auf Trockengewicht bezogen, kann in einigen Fällen vom Stickstoffüberschuß des Nährsubstrats abhängen, in anderen Fällen vom Mangel an Kohlehydraten. Bekanntlich versehen sich die Pflanzen größtenteils mit dem für sie notwendigen Stickstoff schon lange vor der Zeit, da die Bildung von Reproduktionsorganen beginnt. Die Samen der Getreide, wie z. B. Weizen, enthalten in ihrem unreifen Stadium in Proz. mehr Stickstoff als in reifem Zustande. Meine eigenen Analysen

von Samen reiner Weizenlinien, welche unter verschiedenen klimatischen Verhältnissen gezüchtet worden waren, weisen ein Schwanken von 1,75 bis 3,84 Proz. des gesamten Stickstoffs auf Trockengewicht auf. In diesem Falle konnte die große Stickstoffmenge in den Samen nicht von der überschüssigen Stickstoffnahrung aus dem Boden herrühren, sondern vom Mangel an im Prozeß der Photosynthese gebildeten Kohlehydraten abhängen. Wenn die Boviste und Champignons zur Zeit der Sporenbildung ihren Fruchtkörper umbauen und den Stickstoff in Form von Harnstoff akkumulieren, so hängt das weitere Schicksal dieses Vorratsstickstoffs von der Kohlehydratmenge ab, über die der Pilz verfügt. In einigen Fällen wird der ganze Harnstoff (bei Bovisten) umgearbeitet, in anderen (bei Champignons) kann derselbe wegen Überschuß an Stickstoff im Vergleich zu den Kohlehydraten nicht ausgenutzt werden und erscheint dann als Abfall. Aber dies geschieht nicht aus dem Grunde, weil der Pilz den Harnstoff nicht assimilieren kann, sondern weil derselbe in größerer Menge, als dem Organismus nötig, vorhanden ist. Die Frage über die Nahrung der Hutpilze ist wenig bearbeitet infolge der Schwierigkeit und manchmal Unmöglichkeit, dieselben in reiner Kultur zu züchten. Meine Versuche (l. c.) haben gezeigt, daß man in den Hut der Pilze, nämlich in die Hymenschicht derselben, verschiedene Substanzen einführen kann. Mir ist es gelungen, in den Hüten bis zu 14,9 Proz. Harnstoff auf Trockengewicht anzuhäufen; positive Resultate erzielte ich auch bei Einführen und Ablagerung von Salpeter. Die Anordnung der Versuche war folgende: Der Hutpilz wurde der Länge nach in zwei gleiche Hälften zerschnitten und mit dem Stiele im Kontrollfalle in Wasser versenkt, im Versuchsfalle in eine 1 bis 2 proz. Lösung von Harnstoff oder Salpeter. Nach Verlauf von 1 bis 3 Tagen wurde der Versuch unterbrochen, zur Analyse wurden nur die Hälften des Hutes gewählt. Die Pilze blieben am Leben, in denselben fanden die Prozesse der Sporenbildung statt und es waren gar keine Anzeichen von Bakterieneinwirkung zu sehen.

In dieser Arbeit verfuhr ich in derselben Weise, nur versuchte ich, Glucose in den Pilzhut, welcher Harnstoff enthielt, einzuführen. Die Kontrollhälfte wurde mit dem Stiele auf 1 bis 3 Tage in Wasser gesetzt, die Versuchshälfte in eine 0,5- bis 2proz. Lösung von Glucose: die Flüssigkeiten wurden täglich erneuert. Darauf wurde in den Hüten der Harnstoff nach *Fosse* (l. c.) bestimmt, die Menge des ins Filtrat nicht übergegangenen Stickstoffs nach *Kjeldahl* und die Anwesenheit von Glucose durch qualitative Proben. Bei den in Wasser getauchten Kontrollproben fehlte die Glucose stets in den Hüten, in den Versuchsproben ist es gelungen, die Anwesenheit von Glucose festzustellen. Zum Versuch wurden Fruchtkörper von Bovisten (Lycoperdon),

Champignons (Psalliota) und Tricholoma sordidum, deren genaue Artbestimmung ich Prof. *A. A. Jaczewsky* verdanke, ausgewählt.

Für den ersten Versuch wurden Fruchtkörper von Lycoperdon piriforme mit Teilen von zwirnartigem Mycel, auf welchem sie festsaßen, angewandt.

Versuch 1.

Fünf große, völlig gleiche, unreife Fruchtkörper von Lycoperdon piriforme wurden mit ihrem in Wasser gewaschenen Mycelreste versenkt:

I. Drei Exemplare in 50 ccm 1 proz. Harnstofflösung.
II. Zwei Exemplare in 50 ccm 2 proz. Glucoselösung.

Vor dem Versuche wurde aus jedem Fruchtkörper je ein Viertel für die Kontrollbestimmung ausgeschnitten. Nach 5 Tagen war der Versuch beendet; das Mycel und die Stiele wurden verworfen. Die Kontrollen wurden ebenso wie die Versuchsportionen zu Pulver zerrieben, bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann für die Harnstoffbestimmung verwendet.

	Trockengewicht	Harnstoff	
	g	mg	Proz.
0. Kontrolle	0,9468	22,1	2,3
I. Harnstoff	1,7513	77,5	4,4
II. Glucose	1,3765	19,8	1,4

Setzt man die Harnstoffmenge der Kontrollportion gleich 100, so ergibt sich: für die Harnstoffportion 189,3, für die Glucoseportion 61,5.

Der Harnstoff war durch das Mycel eingedrungen und hatte sich in den Fruchtkörpern angehäuft; in der Glucoseportion war die Harnstoffmenge im Vergleich zur Kontrolle von 2,3 auf 1,4 Proz. gesunken. Da sich aber das Trockengewicht der Glucoseportion durch das Aufsaugen der Glucose erhöht hatte, war es erforderlich, eine Bestimmung der verschiedenen Stickstofformen in den Kontroll- und Glucoseportionen auszuführen.

	Gesamt-N mg	Harnstoff-N mg	Harnstoff-N : Gesamt-N Proz.
Kontrolle	72,4	22,1	14,2
Glucose	105,5	19,8	8,7

Die Umrechnung des Harnstoffstickstoffs auf die Gesamtmenge des Stickstoffs, *die unverändert bleibt*, weist mit Bestimmtheit auf eine Verminderung des Harnstoffs in der Versuchs-(Glucose-)portion von 14,2 auf 8,7 Proz. hin.

Eine weitere Folgerung läßt sich aus diesem Versuche ziehen: Der Harnstoff wird vom Mycel des Bovistes heftig absorbiert und dann im Fruchtkörper angehäuft. In Gegenwart von Glucose wird der Harnstoff durch den Pilz verbraucht. Aber welche Verbindungen entstehen dabei? Zur Lösung dieser Frage wurde Versuch 2 aufgestellt, bei dem in der Kontroll- und Versuchsportion die Menge des in Wasser unlöslichen Stickstoffs bestimmt wurde.

Versuch 2.

Neun unreife Exemplare von Lycoperdon molle wurden zur Hälfte zerschnitten, zu je 21,5 g, und mit den Stielen versenkt in I. 50 ccm Wasser, II. 50 ccm 2proz. Glucose.

Nach 48 Stunden wurden beide Portionen auf einem Glase während 3 Tagen stehengelassen, in deren Verlauf ihre Reife und Sporenbildung erfolgte. Beide Portionen wurden zu Pulver zerrieben und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

	I	II
Trockengewicht	1,4517 g	1,6834 g

Das Trockengewicht der zweiten Glucoseportion ist um 16 Proz. höher als das der ersten, während beide zu Anfang des Versuchs gleich waren und je 21,5 g wogen.

Die Pulver beider Portionen wurden mit heißem Wasser extrahiert; der unlösliche Teil des Pilzes wurde zur N-Bestimmung nach *Kjeldahl* benutzt.

	I	II
N im unlöslichen Pilzrest	71,7	81,7

Nicht nur das Trockengewicht, sondern auch die Menge des in Wasser unlöslichen Stickstoffs (d. h. der komplizierten Verbindungen wie Eiweißstoffe und Chitin), hatte bei der Glucoseportion zugenommen.

Im folgenden Versuche (3) wurde gleichzeitig die Harnstoffmenge und der Stickstoff des in Wasser unlöslichen Restes bestimmt.

Versuch 3.

Acht Fruchtkörper von Lycoperdon molle, die zu reifen begannen, wurden der Länge nach zur Hälfte zerschnitten, zu 16,7 g, und mit den Stielen versenkt in I. 50 ccm Wasser, II. 50 ccm Wasser + 1 g Glucose. 3 Tage nach dem Austrocknen wurde in beiden Portionen in gewöhnlicher Weise der Harnstoff und der Stickstoff des unlöslichen Restes bestimmt.

Es erwies sich:

	I (Wasser) mg	II (Glucose) mg
Harnstoff	107,4	89,7
N im wasserunlöslichen Reste . . .	84,2	89,1

In den zum Versuche völlig gleich gewählten Portionen (16,7 g) ergab sich ein großer Unterschied nach 3 Tagen: In der Glucose Verminderung des Harnstoffs von 107,4 mg bis zu 89,7 mg und Erhöhung des in Wasser unlöslichen Stickstoffs von 84,2 mg auf 89,1 mg.

Die folgenden Versuche wurden mit Champignons angestellt.

Versuch 4.

Ein reifes Exemplar Champignon (Psalliota pratensis) wurde in 3 Teile zerschnitten: I. Der Stiel wurde verworfen, ein Teil des Hutes, 11,45 g, wurde schnell bei 30° getrocknet; II. und III., Portionen zu je 16,6 g wurden mit den Stielen auf 3 Tage versenkt; II. in 50 ccm Wasser, III. in 50 ccm 2proz. Glucose. Die Glucoselösung und das Wasser wurden täglich

gewechselt. Nach 3 Tagen wurden die Portionen bei 30° getrocknet, zu Pulver zerrieben und dann bis zu konstantem Gewicht bei 110° getrocknet. Der Gesamtstickstoff wurde nach *Kjeldahl* bestimmt.

	Trockengewicht g	N mg	N Proz.
I. Kontrolle	0,2192	21,8	9,95
II. Wasser	0,1840	18,8	10,23
III. Glucose	0,2402	22,7	9,45

Die Pulver wurden mit Wasser auf dem Wasserbade extrahiert; das Filtrat verdampft und in 70proz. Essigsäure mit Xanthydrol gefällt.

	Trockengewicht	Harnstoff	
	g	mg	Proz.
I. Kontrolle	0,8212	9,22	1,12
II. Wasser	0,8625	33,57	3,89
III. Glucose	0,8592	22,80	2,65

In 1 g Trockensubstanz war Stickstoff in Milligrammen: I. 99,5, II. 102,3, III. 94,5.

Während des Versuchs war also *die Menge der stickstofffreien Substanz* in der zweiten (Wasser) Portion gesunken, in der dritten (Glucose) dagegen gestiegen, im Vergleich zur Kontrollportion.

Um eine deutliche Vorstellung von der Umwandlung des Harnstoffstickstoffs zu erhalten, muß man jede Portion auf 100 mg Gesamtstickstoff umrechnen. Auf 100 mg Gesamt-N kommt Harnstoff-N:

I. Kontrolle 5,25
II. Wasser 17,74
III. Glucose 13,07

Folglich wird die Harnstoffbildung unter dem Einfluß der Glucose gehemmt, entweder weil eine Hemmung der Autolyse stattfindet, oder weil der Harnstoff (vielleicht auch seine Zerfallsprodukte) mit Glucose kompliziertere Stickstoffverbindungen bildet.

Es wurde noch die Bestimmung des Stickstoffs des im Wasser unlöslichen Restes nach der Extraktion der Portionen mit heißem Wasser ausgeführt.

	Gesamt-N in der Substanz	Unlöslich. N	Unlöslich. N Proz.
I. Kontrolle	81,7	47,8	58,5
II. Wasser	88,2	32,9	37,3
III. Glucose	81,19	32,1	39,6

In der Glucoseportion steigt die Menge des unlöslichen Stickstoffs.

Versuch 5.

Desgleichen, nur wurde der Fruchtkörper eines unreifen Champignons von 103,5 g Gewicht genommen. Die Dauer des Versuchs betrug 2½ Tage, das Wasser sowie die 1proz. Glucoselösung wurden täglich gewechselt. Als Endresultat ergab sich in den Portionen:

	N auf Trockengewicht Proz.	Harnstoff Proz.
I. Kontrolle	—	0,46
II. Wasser	7,44	2,27
III. Glucose	6,93	1,81

Auf 100 mg Gesamtstickstoff kommt Harnstoffstickstoff:

II. Wasser . . . . 14,25 Proz.
III. Glucose . . . . 12,20 „

Aus den oben beschriebenen Versuchen geht hervor, daß die Glucose beim Eindringen in den Pilzhut die Autolyse der Gewebe hemmt und die Harnstoffmenge verringert. Hieraus kann man annehmen, daß sich der Harnstoff bei Mangel an Kohlehydraten, wie das Asparagin bei grünen Pflanzen bildet und als Vorrat ablagert. Das Eindringen der Glucose in den Pilz geht langsam vonstatten und diese wird dabei größtenteils umgearbeitet; darum sind jene geringen Mengen von Glucose nicht imstande, die stattfindende Autolyse völlig aufzuhalten, in deren Verlauf sich der Harnstoff bildet. Des weiteren mußte bewiesen werden, daß die Glucose an und für sich keinen Einfluß auf die Harnstoffbestimmung ausüben kann. Wie aus dem Versuch 6 zu ersehen ist, beeinflußt die Anwesenheit der Glucose, sowie ferner das Abdampfen der gleichzeitig Glucose und Harnstoff enthaltenden Flüssigkeit nicht die Bestimmung des letzteren mittels der Xanthydrolmethode.

Versuch 6.

Der Saft von eben zu reifen beginnenden Lycoperdon molle wurde abgepreßt, je 3 ccm auf jede Portion genommen und in derselben der Harnstoff bestimmt:

I. Auf dem Wasserbade während 30 Minuten erwärmt . . . . 9,23 mg Harnstoff
II. Ebenso, nur 100 mg Glucose zugefügt . . 9,30 „ „
III. Ebenso, aber nach Zugabe von Glucose auf dem Wasserbade fast bis zur Trockne abgedampft und wieder bis auf 3 ccm im Wasser gelöst . . . . 9,27 „ „

Die Anwesenheit der Glucose hindert die Harnstoffbestimmung nicht. In den vorigen Versuchen wurden die Pilze bis zu konstantem Gewicht bei 110° getrocknet, um aber dem Einwande, daß die Verminderung des Harnstoffs in der Glucoseportion von der vorhergehenden Behandlung des Versuchsmaterials herstammen könnte, zu entgehen, wurden im nächsten Versuche die Pilzportionen nicht getrocknet, sondern im Mörser mit Wasser zerrieben und dann in gewöhnlicher Weise der Harnstoff bestimmt. Außerdem wurde noch versucht, den Pilzen die Glucose nicht durch den Stiel, sondern direkt darzureichen, indem die Teile des zerschnittenen Hutes in eine 1 proz. Glucoselösung getaucht wurden. Ein solcher Versuch muß aber von sehr kurzer Dauer sein, um die Einwirkung von Bakterien zu vermeiden.

Versuch 7.

Der Hut eines Waldchampignons wurde der Länge nach in zwei Hälften zu je 10 g zerschnitten. Beide Portionen wurden in je 8 Teile zerschnitten und 10 Stunden in einer Petrischale stehengelassen:

I. mit 10 ccm Wasser,
II. mit 10 ccm Wasser + 0,1 g Glucose.

Dann wurden die Portionen zerrieben mit derselben Flüssigkeit, in welcher sie gestanden hatten, und in denselben wurde nun in gewöhnlicher Weise Harnstoff bestimmt.

	I	II
Harnstoff	74,1 mg	62,5 mg

Nach 10 Stunden war die Harnstoffmenge in der Glucoseportion gesunken.

In einem anderen Falle wurden *beide Hälften des Pilzes gleich zerrieben*: I. mit Wasser, II. mit Wasser + 0,1 g Glucose, und es ergab sich, daß die Harnstoffmenge in beiden Portionen gleichbedeutend war:

I. 55,0 mg, II. 55,1 mg,

d. h. die Gegenwart von Glucose hatte die Harnstoffbestimmung nicht beeinflußt.

Der folgende Versuch war ebenfalls von kurzer Dauer, mit unverzüglichem Eintauchen der Teile des Pilzhutes in Wasser oder in 2proz. Glucoselösung; außerdem wurde ein junger Pilz mit wenig Harnstoffinhalt gewählt.

Versuch 8.

Die Hüte von zwei Fruchtkörpern von Champignons wurden der Länge nach in zwei gleiche Portionen zerschnitten, jede Portion wieder in 4 Teile geteilt und 26 Stunden in einer Petrischale liegengelassen:

I. mit 20 ccm Wasser,
II. mit 20 ccm 2proz. Glucose.

Darauf wurden beide Portionen im Mörser mit derselben Flüssigkeit, in der sie gelegen hatten, zerrieben; überall wurde Wasser zugefügt und die Portionen auf dem Wasserbade extrahiert. Im so erzielten Filtrate wurde der Gesamtstickstoff und der Harnstoff bestimmt, der unlösliche Teil des Pilzes wurde ebenso nach *Kjeldahl* verbrannt. Als Harnstoff war vorhanden:

I. Wasser . . . . 9,95 mg
II. Glucose . . . . Spuren

Stickstoff nach *Kjeldahl*:

	I	II
N im unlöslichen Rest	42,9 mg	45,7 mg
N im Filtrat	78,7 „	68,2 „
	121,6 mg	113,9 mg

Um einen Vergleich zwischen der Stickstoffumwandlung in beiden Portionen zu ermöglichen, führen wir das Verhältnis des N im unlöslichen Reste zum Gesamt-N den ganzen Portionen zu:

$$\text{I. } \frac{42{,}9}{121{,}6} = 35{,}2 \text{ Proz.} \qquad \text{II. } \frac{45{,}7}{113{,}9} = 40{,}1 \text{ Proz.}$$

In der Glucoseportion war der Harnstoff verschwunden, dagegen die Menge des unlöslichen Stickstoffs gestiegen.

In einer einzelnen Probe wurde die Bestimmung des Ammoniakstickstoffs unternommen; in der ganzen Portion war vorhanden:

I. 6,4 mg, II. 6,3 mg.

Somit kann die Abnahme des Harnstoffs in der Glucoseportion nicht durch seinen Übergang in Ammoniak erklärt werden. Aus dem Versuch ist zu ersehen, daß der Harnstoff mit Zucker in unlöslichen Stickstoff übergeht. Wir können annehmen, daß in diesem Falle eine Bildung von Eiweißstoffen oder von Chitin stattfindet. Charakteristisch ist, daß der Prozeß der Harnstoffassimilation besonders deutlich bei jungen Exemplaren verläuft. In alten Fruchtkörpern wird diese Erscheinung nicht beobachtet; das hängt damit zusammen, daß nach der Sporenbildung die synthetischen Prozesse, welche durch eine Abnahme des Harnstoffs und eine Zunahme des in Wasser unlöslichen Stickstoffs gekennzeichnet sind, aufhören. In einem Versuche, zu welchem man alte Fruchtkörper von *Tricholoma sordidum* auswählte, deren Hälften, die einen mit Wasser, die anderen mit 2proz. Glucose, 4 Tage stehenblieben, wurde als Endergebnis an Harnstoff erhalten:

I. mit Wasser . . . . . . 60,4 mg
II. mit Glucose . . . . . . 59,4 „

d. h. die Harnstoffmenge war fast unverändert geblieben; unverändert war auch die Menge des in Wasser unlöslichen Stickstoffs. Hieraus ist deutlich zu ersehen, daß es *nicht genügt, einfach Glucose zu verabreichen, sondern man muß diese der Pflanze in einer bestimmten Lebensperiode des Pilzes*, nämlich zur Zeit der Sporenbildung, zusetzen.

Im weiteren versuchte ich, den Pilzen gleichzeitig Glucose und Harnstoff zu verabreichen; letzterer wird nach meinen Beobachtungen (l. c.) durch den Pilzstiel gut absorbiert und im Hute augehäuft. Obgleich die Glucose beim Eindringen in den Pilzhut dort Harnstoff vorfindet, so zeigte sich doch, daß bei gleichzeitiger Verabreichung von Glucose und Harnstoff von außen eine Zunahme des in Wasser unlöslichen Stickstoffs stattfindet, d. h. der Pilz assimiliert diese beiden Substanzen und bildet komplizierte Stickstoffprodukte.

Versuch 9.

Der Fruchtkörper eines Champignons wurde der Länge nach in zwei fast gleiche Teile zerschnitten und mit den Stielen versenkt in:

I. 50 ccm 2proz. Glucose,
II. 50 ccm 2proz. Glucose + 0,25 g Harnstoff.

Nach 3 Tagen war der Versuch beendet; die Stiele wurden verworfen, die Hüte im Mörser zerrieben und auf dem Wasserbade extrahiert. Die Masse von beiden Portionen wurde abfiltriert und mit heißem Wasser gewaschen. In einzelnen Portionen des Filtrats wurde Harnstoff und Gesamtstickstoff bestimmt; der in Wasser unlösliche Rest des Pilzes wurde nach *Kjeldahl* verbrannt.

	I (Glucose) mg	II (Glucose + Harnstoff) mg
N im unlöslichen Rest	37,2	46,7
N im Filtrat	38,5	37,9
N im ganzen	75,7	84,6

Harnstoff in Milligrammen:

I. 26,8, II. 42,1.

Der Harnstoff trat zusammen mit der Glucose ein und wurde in die unlösliche Stickstofform umgewandelt. In einzelnen Portionen des Filtrats wurde die Bestimmung des Ammoniakstickstoffs ausgeführt. Seine Menge war in beiden Fällen gleich:

I. 1,6 mg, II. 1,6 mg.

Wir sehen eine Zunahme des unlöslichen Stickstoffs in der Portion, der von außen Harnstoff zugegeben wurde; wenn wir den überschüssigen Harnstoffstickstoff abziehen, so läßt sich die Gesamtsumme des Stickstoffs in den Portionen ausdrücken, wie folgt:

I. 75,7 mg, II. 77,4 mg,

und unlöslicher Stickstoff

I. 37,2 mg, II. 46,7 mg.

Drückt man aber das Verhältnis des unlöslichen Stickstoffs zum Stickstoff der ganzen Portion in Prozenten aus, so erhält man:

I. 49,2 Proz., II. 60,4 Proz.,

d. h. eine bedeutende Zunahme von unlöslichem Stickstoff in der Harnstoffportion.

Versuch 10.

Junge Fruchtkörper von Tricholoma sordidum wurden der Länge nach zerschnitten und stehengelassen in:

I. 100 ccm 1,5 proz. Glucose,
II. 100 ccm 1,5 proz. Glucose + 1 g Harnstoff.

Nach 4 Tagen war der Versuch beendet. Es wurden nur die Hüte gewählt, bei 30 und 110° getrocknet und zu Pulver zerrieben. Dann wurde in einzelnen Proben der Harnstoff in den Filtraten nach der Extraktion mit heißem Wasser auf dem Wasserbade bestimmt.

	I (Glucose)	II (Glucose + Harnstoff)
Trockengewicht in g .	0,7787	0,8612
Harnstoff in mg . . .	41,0	176,55
Harnstoff in Proz. . .	5,26	20,5

Auf 1 g Trockensubstanz kam in Wasser unlöslicher Stickstoff:

I	II
29,8 mg	37,0 mg
oder auf 100 „	124,1 „

In einzelnen gewogenen Teilen des Trockenpulvers der ersten und zweiten Portion wurde die Bestimmung des Stickstoffs im Niederschlag von essigsaurem Blei unternommen; beide Portionen wurden mit 50 ccm Wasser erwärmt und nach dem Erkalten mit Bleiessig gefällt.

	I (Glucose)	II (Glucose + Harnstoff)
Substanz	0,7644	0,7340
N im Bleiniederschlag . . .	29,35 mg	37,43 mg
N im Niederschlag in Proz. auf Trockengewicht . . .	3,84 Proz.	5,10 Proz.

Folglich enthält 1 g Trockensubstanz im Bleiniederschlag Stickstoff:

	I	II
	38,4 mg	51,0 mg
oder auf 100	„	132,7 „

Im Bleiniederschlag befindet sich außer Proteinstickstoff auch der Stickstoff des Chitins und seiner Derivate; die erwähnten Daten weisen auf eine große synthetische Arbeit in Gegenwart von Glucose und Harnstoff hin. Damit wird meine früher ausgesprochene Ansicht, daß der Harnstoff in Gegenwart von Glucose für synthetische Zwecke ausgenutzt wird, bestätigt.

Versuch 11.

Drei junge Champignonexemplare wurden der Länge nach in drei fast gleiche Teile zerschnitten; es wurden je drei Teile von jedem Pilze gewählt und 3 Tage stehengelassen; die Stiele wurden versenkt in:

I. 50 ccm Wasser,
II. 50 ccm 2proz. Glucose,
III. 50 ccm 2proz. Glucose + 0,5 g Harnstoff.

Darauf wurden die Stiele verworfen, die Hüte im Mörser zerrieben und auf dem Wasserbade mit heißem Wasser extrahiert; nachher wurde im Filtrat der Harnstoff und der Gesamtstickstoff bestimmt, der unlösliche Teil des Pilzes nach *Kjeldahl* verbrannt.

	I (Wasser)	II (Glucose)	III (Glucose + Harnstoff)
N des unlösl. Restes in mg .	34,3	36,1	52,2
N des Filtrates in mg . . .	128,0	98,9	109,6
	162,3	135,0	161,8
$\frac{\text{N des unlösl. Restes}}{\text{N der Gesamtportion}}$ in Proz.	21,2	26,7	32,3

Harnstoff in Milligrammen:

I. 55,0, II. 40,5, III. 67,3.

Das Filtrat der zweiten und dritten Portion gab die *Fehling*sche Reaktion; folglich war die Glucose gut in den Pilzhut eingedrungen.

Es muß noch hervorgehoben werden, daß in der Glucoseportion die Menge des unlöslichen Stickstoffs von 21,2 auf 26,7 Proz. gestiegen war und in der Portion Glucose mit Harnstoff sogar auf 32,3 Proz. Das Bild ist dasselbe, wie in den vorigen Versuchen: Die Glucose fördert die Harnstoffassimilation, und im Falle einer gleichzeitigen Zugabe von Harnstoff und Glucose wird der Anhäufungsprozeß des unlöslichen Stickstoffs noch viel bedeutender gesteigert.

Alle oben erwähnten Versuche zeigen uns, daß große Harnstoffanhäufungen mit einem Mangel an Kohlehydraten in Pilzen verbunden sind, ähnlich wie dieser Mangel bei grünen Pflanzen zur Asparaginbildung führt. Der in den Pilzen angehäufte Harnstoff wartet auf eine Zufuhr von Kohlehydraten, um zur Bildung von Eiweißstoff und Chitin überzugehen. Fehlen Kohlehydrate oder sind sie nicht in genügender Menge vorhanden, so bleibt der Harnstoff in den Pilzen,

selbst beim Absterben, wie das an den Fruchtkörpern von Champignon, Tricholoma usw. beobachtet wird. *In diesem Falle erscheint der Harnstoff als Abfallsprodukt, aber mit demselben Rechte müssen wir auch das Asparagin als Abfallsprodukt bezeichnen bei derjenigen grünen Pflanze, welche im Dunkeln aufgewachsen ist, sich nicht bis zum Lichte emporheben konnte* und wegen Mangel an Kohlehydraten abgestorben ist.

Bei meinen Versuchen ist es mir gelungen zu zeigen, daß die Glucose in den Pilzhut eindringt und sich dort anhäuft; sie erhöht das Trockengewicht der Versuchsportion. Nachdem die Glucose in den Pilzhut eingedrungen ist, hemmt sie die daselbst stattfindenden autolytischen Prozesse, welche zur Harnstoffbildung führen. In einigen Versuchen beobachten wir eine Abnahme und sogar ein Verschwinden des Harnstoffs nach Einführung von Glucose in den Pilz; wir müssen feststellen, daß der Harnstoff in Gegenwart von Glucose für synthetische Prozesse dient und daß der Mangel an Glucose als ein begrenzender Faktor bei der Ausnutzung des Harnstoffstickstoffs durch den Pilz erscheint. Das Verschwinden des Harnstoffs in Gegenwart von Glucose führt zur Anhäufung komplizierter Stickstoffverbindungen, welche durch Bleiessig fällbar und in Wasser unlöslich sind. Charakteristisch ist, daß die Abnahme der Harnstoffmenge in Gegenwart von Glucose in den Fruchtkörpern stattfindet, in denen der Prozeß der Sporenbildung verläuft. Führt man Glucose in alte Fruchtkörper ein, so dringt sie zwar ein, aber sie ruft weder eine Abnahme des Harnstoffs hervor, noch führt sie zur Synthese komplizierter Stickstoffverbindungen: folglich werden nach der Sporenbildung die synthetischen Prozesse eingestellt. Gibt man aber den Pilzen in einem Falle nur Glucose, im anderen Glucose mit Harnstoff, so verlaufen im letzteren Falle die Syntheseprozesse von komplizierten Stickstoffverbindungen viel intensiver; folglich wird selbst der von außen eingeführte Harnstoff durch den Pilz in Gegenwart von Glucose assimiliert. Der Harnstoff bildet sich nach meinen Untersuchungen als Resultat des Zerfalls von Eiweißstoffen, welche zuerst Aminosäuren und dann Ammoniak bilden. Aus dem letzteren und aus Kohlensäure wird schon synthetisch der Harnstoff in Gegenwart von Oxydationsprozessen gebildet.

In ähnlicher Weise entsteht der Harnstoff auch im tierischen Organismus, ebenso aus dem Eiweißstoff über das Ammoniakstadium. *Werner*[1]) nimmt jedoch an, daß der Harnstoff in den Pflanzen stets als Endprodukt des Eiweißstoffzerfalls gebildet und nur darum nicht dort angehäuft wird, weil in den Pflanzen die Eiweißstoffsynthese überwiegt. Ich glaube, daß in denjenigen Pflanzen, welche Asparagin und Glutamin enthalten, das Verweilen des Harnstoffs stets mit dem

---

[1]) *E. A. Werner*, Dublin Journ. of med. Sciences 4, 517, 1922.

Argininzerfall verbunden sein muß; große Harnstoffmengen können wir hier nicht erwarten, und nur einige Pilze häufen denselben als Stickstoffvorratsprodukt an, das dem Asparagin entspricht. *Boussingault*[1]) hat die Prozesse der Eiweißstoffmetamorphose in der Pflanzen- und Tierzelle verglichen; im tierischen Organismus wird als Endprodukt Harnstoff gebildet, bei Pflanzen in Abwesenheit von Kohlehydraten — Asparagin. Zu diesem verallgemeinerten Schema fügen wir jetzt neue Tatsachen hinzu, welche dasselbe ergänzen. Wir kennen Fälle, bei denen in den Pilzen auf Kosten des Eiweißzerfalls Aminosäuren, welche durch Desaminierung Ammoniak liefern, gebildet werden; letzterer wird zur Bildung von Harnstoff, der sich als Stickstoffvorratsprodukt anhäuft, benutzt. Im Falle eines Mangels an Kohlehydraten bleibt der Harnstoff unausgenutzt und der Pilz, welcher ihn bis zu 13 Proz. angehäuft hat, stirbt an Harnstoff bereichert ab (Champignon). Im anderen Falle, wo zur Zeit der Sporenbildung ein Zufluß von Kohlehydraten stattfindet, nimmt die Harnstoffmenge ab, weil dieser vom Pilze für synthetische Prozesse ausgenutzt wird.

Der Pilzharnstoff ist in Abwesenheit von Kohlehydraten ein Abfallsprodukt, in Gegenwart derselben ein Nahrungsvorratsstoff, analog dem Asparagin und Glutamin.

Schlüsse.

1. Taucht man Fruchtkörper von Bovisten (Lycoperdon), Champignons (Psalliota) und Tricholoma mit den Stielen in eine Glucoselösung, so dringt letztere in den Pilzhut ein, was deutlich durch die *Fehling*sche Reaktion und durch Zunahme des Trockengewichts des Pilzes festgestellt werden kann.

2. Die in den Pilz eindringende Glucose hemmt in einem Falle die in den Pilzgeweben stattfindenden autolytischen Prozesse, welche zur Harnstoffbildung führen, im anderen Falle ruft sie eine Abnahme und sogar ein Verschwinden des bis zum Versuch dort anwesenden Harnstoffs hervor.

3. Der Verbrauch von Harnstoff in Gegenwart von Glucose wird stets von einer Zunahme des durch Bleiessig fällbaren Stickstoffs und überhaupt des Stickstoffs komplizierter, in Wasser unlöslicher Verbindungen begleitet.

4. In den Pilzen häuft sich der Harnstoff bei Mangel oder Fehlen von Kohlehydraten an; in Gegenwart derselben wird er für synthetische Prozesse des Pilzes verbraucht. Darum müssen wir den Harnstoff als eine Vorratssubstanz, analog dem Asparagin und Glutamin, ansehen.

---

[1]) *Boussingault*, C. r. 58, 917, 1864.

Über die Ursache des verschiedenen Harnstoffgehalts in Pilzen.

Von

Nicolaus N. Iwanoff.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität zu Petersburg-Leningrad.)

(Eingegangen am 26. November 1924.)

Die Menge des Stickstoffs in ein und denselben Pflanzenarten variiert stark und hängt von dem Gehalt des Stickstoffs im Boden ab, von der Lichtnahrung, von den klimatischen Verhältnissen und anderem. Selbst die Samen der reinen Weizenlinien, welche auf verschiedenen Böden gewachsen sind, weisen Schwankungen des Stickstoffgehalts von 1,75 bis 3,84 Proz. auf. Es ist daher nicht verwunderlich, daß auch bei Pilzen große Schwankungen im Stickstoffgehalt beobachtet werden. Die Pilze wachsen auf verschiedenen Nahrungssubstraten, bald als Saprophyten in einem stickstoffreichen Medium, bald als Parasiten auf Baumstämmen, wo kleine Mengen Stickstoff vorhanden sind. Hieraus folgt, daß wir in den ersteren viel Stickstoff erwarten können und in den zweiten wenig. Nehmen wir die alten Analysen von *Mörner*[1]), so sehen wir, daß beim Champignon (Agaricus campestris) die Menge des Gesamtstickstoffs gleich 7,38 Proz. auf Trockengewicht ist, beim Schwamm (Polyporus ovinus) aber nur 1,8 Proz.; dieser große Unterschied wird durch verschiedene stickstoffhaltige Nahrungssubstrate, auf denen die genannten Pilze wachsen, erklärt.

Nachdem der Harnstoff in einigen Pilzen[2]) aufgefunden worden war, kamen viele Autoren zu verschiedenen Resultaten, indem sie ein und dieselben Pilze analysierten. *Bamberger* und *Landsiedl*[3]) haben den Harnstoff in Bovisten (Lycoperdon) entdeckt, aber *Goris* und *Mascré*[4]) haben in denselben Pilzen keinen Harnstoff aufgefunden, denn sie schreiben in ihrer Arbeit: „Nous ne l'avous pas retrouvée non plus dans Lycoperdon Bovista et L. gemmatum Fl., où *Bamberger* et *Landsiedl* l'avaient signalée."

Ich habe gezeigt[5]), daß die Harnstoffmenge in den Pilzen nicht konstant bleibt; sie kann gleich Null in jungen Fruchtkörpern sein,

---

[1]) *Mörner*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **10**, 503, 1886; Chem. Centralbl. 1886, S. 809; auch *Zellner*, Chemie der höheren Pilze. Leipzig 1907.

[2]) Siehe die Literatur in meiner vorigen Abhandlung.

[3]) *Bamberger* und *Landsiedl*, Monatsh. f. Chem. **24**, 218, 1903.

[4]) *A. Goris* und *A. Mascré*, C. r. **153**, 1082, 1911.

[5]) Siehe die Literatur in meiner vorigen Abhandlung.

dann erreicht sie das Maximum zur Zeit der Sporenbildung und der Harnstoff verschwindet vollständig in den reifen Sporen. Alle meine Versuche führten mich zu der Überzeugung, den Harnstoff als eine Stickstoffvorratssubstanz anzusehen, welche in den Sporen verbraucht wird; diese Ansicht wurde besonders befestigt, nachdem es mir gelungen war zu zeigen (s. die vorige Abhandlung), daß in Gegenwart von Kohlehydraten die Harnstoffmenge abnimmt, weil derselbe als stickstoffhaltiges Nahrungsmaterial verbraucht wird.

In meinen weiteren Untersuchungen über Harnstoff bei Pilzen begegnete ich großen Schwankungen im Harnstoffgehalt bei ein und denselben Arten. Ich legte mir die Frage vor, warum einige Pilze bald mehr, bald weniger Harnstoff anhäufen. Seit langem führe ich Analysen verschiedener Fruchtkörper von Pilzen aus, welche Harnstoff enthalten, und bestimme in denselben die verschiedenen Formen des Stickstoffs. Bei der Durchsicht der Protokolle meiner Versuche wurde meine Aufmerksamkeit auf den Umstand gelenkt, daß die Boviste (Lycoperdon) den Harnstoff nur in dem Falle anhäufen, wenn sie überhaupt große Mengen Stickstoff enthalten; in einigen Fällen konnte man sehen, daß *die Fruchtkörper des Lycoperdon piriforme in keinem Entwicklungsstadium, selbst nicht zur Zeit der Sporenbildung, Harnstoff bilden, wenn die Menge des auf Trockengewicht berechneten Gesamtstickstoffs in ihnen sehr unbedeutend ist und zwischen 3,49 und 4,14 Proz. schwankt.* Weiter unten gebe ich in der Tabelle die Analysen von verschiedenen Exemplaren ein und derselben Art Lycoperdon piriforme wieder.

Lycoperdon piriforme.

Versuchsnummer	Grad der Reife	Gesamt-N in Proz. auf Trockengewicht	Harnstoff in Proz. auf Trockengewicht
1	Stadium der Sporenbildung	7,9	4,3
2	„ „ „	6,9	1,3
3	unreif	5,7	0,55
4a	„	3,5	0
4b	Stadium der Sporenbildung	4,2	0

Analytische Belege:

1.	1,8837 g	ergaben	148,9	mg	N,
	1,2231 g	„	52,59	„	Harnstoff;
2.	0,3956 g	„	27,39	„	N,
	6,6950 g	„	84,57	„	Harnstoff;
3.	0,4487 g	„	25,82	„	N,
	7,1660 g	„	39,19	„	Harnstoff;
4a.	0,5365 g	„	18,75	„	N,
	2,5134 g	„	0	„	Harnstoff;
4b.	0,9711 g	„	40,77	„	N,
	3,4217 g	„	0	„	Harnstoff.

Hier ist deutlich zu ersehen, wie die Harnstoffmenge abnimmt mit dem Sinken des Gehalts an Gesamtstickstoff (auf Trockengewicht berechnet). Von besonderem Interesse ist der vierte Fall, wo im Lycoperdon piriforme, selbst am Anfang der Sporenbildung, keine Spuren von Harnstoff aufzufinden waren.

In der Gruppe der Gasterales ergab nach meinen Angaben die größte Harnstoffmenge Bovista nigrescens, und auch diese variierte in betreff des Gesamtstickstoffgehalts.

Bovista nigrescens.

Versuchsnummer	Reifestadium	Gesamt-N in Proz. auf Trockengewicht	Harnstoff in Proz. auf Trockengewicht
1	unreif	6,4	1,7
2	"	11,7	9,9

Analytische Belege.

1.	0,1120 g	ergaben	7,19 mg	N,
	0,4750 g	"	8,08 "	Harnstoff;
2.	1,5148 g	"	177,3 "	N,
	1,5148 g	"	150,9 "	Harnstoff.

Als ich einen Vertreter der Gasterales, Scleroderma vulgare, der Analyse unterwarf, fand sich in demselben keine Spur von Harnstoff[1]), obgleich die Analyse während des Stadiums der beginnenden Sporenbildung angestellt wurde; gleichzeitig ergab es sich, daß der Pilz sehr kleine Mengen Gesamtstickstoff enthält, da auf 2,8345 g Trockengewicht 130,58 mg N oder 4,60 Proz. erzielt wurden.

Eine andere Gruppe Hutpilze, Agaricaceae, gibt uns dieselben Verhältnisse zwischen der Menge des Gesamtstickstoffs und dem Harnstoff. Ich habe zwei Arten der Gattung Psalliota (Champignon), nämlich Ps. pratensis und Ps. campestris analysiert.

Psalliota pratensis (ein reifes Waldexemplar).

0,3453 g ergaben 22,92 mg Gesamt-N, d. h. 6,64 Proz. Gesamt-N,
2,4499 g " 39,4 " Harnstoff, d. h. 1,61 " Harnstoff.

Bei verhältnismäßig kleinem Gehalt an Gesamtstickstoff wurden nur 1,61 Proz. Harnstoff erzielt; als ich mich aber zum Kulturchampignon, Ps. campestris, wandte, der bei mir im Treibhause auf stickstoffreichem Dünger kultiviert worden war, fand ich in den reifen Fruchtkörpern eine bedeutende Menge sowohl des Gesamtstickstoffs wie auch des Harnstoffs vor. Gewöhnlich wurde die eine Hälfte des Hutes analysiert und dann nach Verlauf von einigen Tagen die zweite Hälfte sowohl auf Gesamtstickstoff, wie auch auf Harnstoff. Die

[1]) *J. Zellner*, (Sitzungsber. Wien. Akad. **127**, IIb, 411, 1918) fand auch keinen Harnstoff bei Scleroderma.

Fruchtkörper wurden, nachdem sie zu Pulver zerrieben waren, bis zu konstantem Gewicht getrocknet[1]).

Psalliota campestris (reife Exemplare).

Versuchs-nummer	Portionen	Gesamt-N in Proz. auf Trockengewicht	Harnstoff in Proz. auf Trockengewicht
1 a	Kontrolle	10,4	5,0
1 b	ebenso nach 3 Tagen	11,2	8,1
2 a	Kontrolle	10,8	4,9
2 b	ebenso nach 4 Tagen	12,2	10,9
3 a	Kontrolle	12,2	9,7
3 b	ebenso nach 4 Tagen	12,7	12,9

Analytische Belege:

Versuch 1a.	0,8239 g	ergaben	85,58 mg	Gesamt-N,
	0,8239 g	,,	41,48 ,,	Harnstoff;
Versuch 1b.	0,7672 g	,,	85,60 ,,	Gesamt-N,
	0,7672 g	,,	62,29 ,,	Harnstoff;
Versuch 2a.	0,5916 g	,,	64,35 ,,	Gesamt-N,
	0,5916 g	,,	29,28 ,,	Harnstoff;
Versuch 2b.	1,1717 g	,,	142,68 ,,	Gesamt-N,
	1,1717 g	,,	87,11 ,,	Harnstoff;
Versuch 3a.	0,4450 g	,,	54,48 ,,	Gesamt-N,
	0,4450 g	,,	43,14 ,,	Harnstoff;
Versuch 3b.	1,0631 g	,,	134,86 ,,	Gesamt-N,
	1,0631 g	,,	137,01 ,,	Harnstoff.

In allen Versuchen mit Champignons sehen wir die Anhäufung sehr bedeutender Harnstoffmengen, wenn im Pilze überhaupt viel Stickstoff vorhanden war. Von Interesse ist, daß, wie im zweiten Versuch zu ersehen, bei verhältnismäßig großem Stickstoffgehalt von 10,8 Proz. nur 4,9 Proz. Harnstoff vorhanden waren. Nach viertägigem Reifen war aber die Menge des Gesamtstickstoffs im Fruchtkörper bis zu 12,2 Proz. gestiegen infolge der Verbrennung des stickstofffreien Materials, und die Menge des Harnstoffs war um mehr als das Doppelte gestiegen und hatte 10,9 Proz. erreicht.

Solche große Mengen Stickstoff und infolgedessen auch die Harnstoffanhäufung werden zweifellos dadurch erklärt, daß der Pilz eine reichliche stickstoffhaltige Nahrung erhalten hatte. Im Jahre 1923 kultivierte ich Champignons aus ein und demselben Mycel in zwei Kisten mit Dünger von verschiedener Herkunft. Es zeigte sich, daß der Harnstoffgehalt sich in den einzelnen Exemplaren der Fruchtkörper, welche in diesen Kisten aufgewachsen waren, stark unterschied.

[1]) Die Versuchsmethodik mit Champignons ist beschrieben: Diese Zeitschr. 143, 62, 1923.

Psalliota campestris.

	Harnstoffgehalt in Proz. auf Trockengewicht				
	I	II	III	IV	V
1. Kiste . .	1,48	1,92	2,32	2,53	2,86
2. „ . .	3,47	3,81	3,87	3,93	4,12

In der zweiten Kiste wurden infolge der größeren Menge von stickstoffhaltigem Dung bedeutend größere Harnstoffanhäufungen erzielt. Nachdem in der zweiten Kiste die Fruchtkörperbildung aufgehört hatte, wurde in die Kiste ergänzender stickstoffhaltiger Dung hinzugefügt; darauf fingen von neuem Champignons zu wachsen an, aber mit einem größeren Harnstoffgehalt als früher.

	Trockengewicht	Harnstoff	
	g	mg	Proz.
A. Der letzte Champignon vor dem Düngen .	1,1917	41,4	3,47
B. „ erste „ nach „ „ .	0,2884	15,9	5,60

Die Fruchtkörper waren im Stadium der höchsten Reife entnommen; nach dem Düngen war die Harnstoffmenge von 3,47 bis auf 5,60 Proz. gestiegen. Somit ist ganz deutlich die Abhängigkeit zwischen der stickstoffhaltigen Nahrung und dem Anhäufen des Harnstoffs im Fruchtkörper des Pilzes erwiesen.

In diesem Jahre (1924) sind bei mir im Treibhause in den Kisten, wo das Mycel von Champignons eingesetzt war, viele Fruchtkörper von *Tricholoma sordidum* gewachsen. Die Analyse ergab folgende Resultate:

Tricholoma sordidum.

0,3831 g	ergaben	38,21 mg	Gesamt-N,	d. h.	9,97 Proz.
1,4204 g	„	58,65 „	Harnstoff,	d. h.	4,13 „

Auf diese Weise hat sich auch hier viel Harnstoff bei bedeutendem Stickstoffgehalt angehäuft. Von Interesse ist, daß bei Arten ein und desselben Gattung, je nach dem Aufenthaltsorte, nicht übereinstimmende Mengen Stickstoff und Harnstoff beobachtet werden. Weiter unten führe ich Analysen von *Pholiota spectabilis* und *Pholiota mutabilis*, welche in völlig reifem Zustande entnommen wurden, an:

Benennung des Pilzes	Substrat, auf dem der Pilz gewachsen	Gesamt-N in Proz. auf Trockengewicht	Harnstoff in Proz. auf Trockengewicht
Pholiota spectabilis .	Waldhumusboden	7,0	2,4
„ mutabilis . .	Birkenstamm	2,5	0

Analytische Belege:

Ph. spectabilis	0,4980 g	ergaben	34,89 mg	N,
	2,8118 g	„	68,8 „	Harnstoff;
Ph. mutabilis	0,7914 g	„	19,86 „	N,
	1,2713 g	„	0 „	Harnstoff.

Bei Pholiota mutabilis, welcher auf an Stickstoff äußerst armem Substrat, auf dem Birkenstamme, aufgewachsen war, hatte sich sehr wenig Stickstoff und keine Spur von Harnstoff angefunden.

Dieser Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Gesamtstickstoff und der Bildung und Anhäufung von Harnstoff in Pilzen stellte mich vor die Notwendigkeit eines Versuchs, reine Kulturen von Hutpilzen auf verschiedenen sterilisierten Nahrungsmedien zu züchten. In dieser Hinsicht wurde mir eine große Hilfe von seiten des Mykologen Prof. *A. A. Jaczewsky* zuteil, der schon seit längerer Zeit Kulturen von Hutpilzen züchtete; ich spreche ihm hier meinen tiefsten Dank aus für seine Ratschläge und für die Bestimmung einzelner Pilzarten.

Versuche mit reinen Kulturen von Champignon.

Zur Entwicklung des Pilzes wurden feste Medien entweder mit Agar oder mit Gelatine angefertigt; in dem einen wie auch in dem anderen Falle wurde Malzextrakt hinzugefügt, die Reagenzröhren mit den Medien wurden sterilisiert und unter sterilen Bedingungen mit einer kleinen Menge Fruchtkörper von Champignon geimpft. Nach einiger Zeit zeigte sich das Wachsen des Mycels, welches sehr langsam binnen 1 bis 5 Monaten heranwuchs. Es war kein einziges Mal gelungen, Fruchtkörper zu erzielen.

Versuch 1.

Reine Kultur von Champignon auf Gelatine mit einer kleinen Menge Malzextrakt. Das nach 5 Monaten gebildete weiße Mycelhäutchen wurde analysiert. Das Gewicht des Häutchens betrug 0,1590 g. Im Häutchen und im Nahrungsmedium wurde der Harnstoff nach *Fosse* bestimmt.

	Dixanthylharnstoff mg	Harnstoff mg
Im Nahrungsmedium	31,6	4,51
„ Mycel	5,9	0,84

Während der Entwicklungszeit hat das Mycel 5,35 mg Harnstoff gebildet, welcher hauptsächlich in das Substrat übergegangen war. Es wurde nach *Kjeldahl* die Menge des Gesamtstickstoffs im Nahrungsmedium bestimmt: 90,9 mg. Folglich häuft der Champignon in reiner Kultur bedeutende Harnstoffmengen an.

Versuch 2.

Dasselbe, der Versuch dauerte 3 Monate: bis zum konstanten Gewicht getrocknet, wog das Mycelhäutchen 10,4 mg. Im ganzen fanden sich im Mycel und im Pilze zusammen 1,79 mg Harnstoff (oder 12,5 mg Dixanthylharnstoff). Berechnet man die Harnstoffmenge (1,79) auf trockenes Mycel (10,4), so ergeben sich 27,2 Proz. Harnstoff. Im Nahrungsmedium wurden 88,6 mg Gesamtstickstoff gefunden.

Versuch 3.

Champignonkultur auf Sägespänen mit kleiner Menge Pepton und Malzextrakt. Nach 3 Monaten hatte sich ein weißer Mycelpilz gebildet. Die Kultur wurde in eine *Erlenmeyer*sche Flasche von 7 cm Durchschnitt übergeführt. Das Mycel von Sägespänen zu reinigen, war nicht gelungen. Im wässerigen Extrakt wurde der Stickstoff (nach *Kjeldahl*) und der Harnstoff bestimmt.

Im Medium fanden sich im ganzen 20,8 mg Stickstoff. Keine Spur von Harnstoff. Aus dem Versuch ist zu ersehen, daß die Armut des stickstoffhaltigen Substrats die Mycelbildung zwar nicht störte, aber doch keine Harnstoffbildung zuließ.

Versuch 4.

Es wurde eine reine Kultur Champignon in zwei Nahrungsmedien ausgesät: 1. zwei Reagenzröhren mit Agar + 3 ccm Malzextrakt, 2. zwei Röhren mit 10 Proz. Gelatine und derselben Menge Malzextrakt. Das Wachstum dauerte 3 Monate; es hatte sich ein Mycelfilz gebildet, aber auf der Gelatine war die Entwicklung des Pilzes reicher als auf Agar. Aus den Medien wurde durch mehrfaches Kochen derselben mit Alkohol der Harnstoff extrahiert; außerdem wurde der Gesamtstickstoff des Nahrungsmediums bestimmt.

Kultur	Gesamt-N der Kultur mg	Harnstoff mg
1. Agar mit Extrakt . . .	8,8	0
2. Gelatine mit Extrakt .	74,8	4,92

Obwohl die Entwicklung des Mycels auf Agar mit Extrakt stattfand, fand sich dort keine Spur von Harnstoff, während bei reichlicher Stickstoffnahrung bei der Gelatine 4,92 mg Harnstoff erzielt wurden. Es ist nicht außer acht zu lassen, daß die Methode der Harnstoffbestimmung nach *Fosse* eine sehr genaue ist und die Bestimmung desselben in Lösungen, die sogar nur 0,1 mg enthalten, ermöglicht; der Dixanthylharnstoffniederschlag ist siebenmal größer; in diesem Versuch beträgt er 34,7 mg.

Außerdem wurde in diesem Versuch die Probe angestellt, das Trockengewicht des Mycels zu bestimmen; im ersten Falle war es unmöglich, vom Agar das Mycelhäutchen abzusondern. Bei der Gelatine

gelang es, weil diese eintrocknete; es ergaben sich 13,0 mg; Harnstoff in dieser Kultur 4,92 mg, berechnet man denselben auf Trockengewicht des Mycels, so beträgt die Harnstoffmenge 37,9 Proz.

Es bildet sich also der Harnstoff nur bei bedeutendem Überschuß der Stickstoffnahrung des Pilzes; andernfalls wächst der Pilz zwar, besitzt aber schon nicht mehr den wenn auch nur zeitweiligen Überschuß von Stickstoff, welcher in Form von Harnstoff abgelagert werden könnte. Diese ersten Versuche mit reinen Kulturen von Champignon geben überhaupt den Schlüssel zur Aufklärung der Frage über die Bildung und Anhäufung von Harnstoff in Pilzen. Jetzt erscheint es uns nicht merkwürdig, daß selbst Lycoperdon piriforme keinen Harnstoff enthalten kann, wenn die Menge des Gesamtstickstoffs unbedeutend ist. *Die Harnstoffbildung in Pilzen weist stets auf einen Überschuß der Stickstoffnahrung oder auf Mangel, vielleicht zeitweiligen, an Kohlehydraten hin.* In letzterem Falle kann man den Harnstoff wieder auf synthetische Prozesse des Pilzes richten, indem man demselben Glucose zugibt. Es ist möglich, daß bei allen höheren Pilzen, welche kein Glutamin noch Asparagin bilden, der Harnstoff festgestellt werden kann, wenn es uns gelingen wird, entweder dieselben mit überschüssigem Stickstoff zu versorgen, oder die Zufuhr von Kohlehydraten zu vermindern. Obgleich bei nahen Verwandten der Boviste, Scleroderma vulgare, in keinem Entwicklungsstadium Harnstoff vorgefunden worden ist, so kann das doch nur durch einen niedrigen Stickstoffgehalt (4,6 Proz.) überhaupt erklärt werden; es ist möglich, daß eine Ergänzungszugabe von Stickstoff zu einer größeren Anhäufung des Gesamtstickstoffs führen kann und damit auch zur Harnstoffbildung.

Die Versuche mit reinen Kulturen von Hutpilzen werden von mir weitergeführt, und ich erwarte von ihnen die Lösung einiger Fragen über Stickstoffumwandlungen.

Zum Schlusse komme ich zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Bildung und Anhäufung von Harnstoff in Pilzen hängt entweder von überschüssiger Stickstoffnahrung oder von Mangel, manchmal zeitweiligem, an Kohlehydraten ab.

2. Ein und dieselbe Art Pilze, wie z. B. Lycoperdon piriforme, kann Harnstoff bis zu 4,3 Proz. anhäufen, wenn der Gehalt an Gesamtstickstoff in demselben verhältnismäßig hoch (7,9 Proz.) ist; in anderen Fällen, wo die Stickstoffmenge klein (4,2 Proz.) ist, zeigt sich gar kein Harnstoff in demselben.

3. In reiner Kultur häuft der Champignon bei Überschuß von Stickstoffnahrung (Gelatine + Malzextrakt) große Mengen Harnstoff an, bei kleinerer Zugabe von Stickstoff (Agar + Malzextrakt) wird keine Spur von Harnstoff gebildet.

Über die Einwirkung von Stoffwechsel-Endprodukten auf die Pflanzen.

IV. Mitteilung: Einwirkung N-freier pflanzlicher Stoffwechsel-Endprodukte auf die Keimung von Samen: Harze, Farbstoffe.

Von

Wilhelm Sigmund (Prag).

(Aus der deutschen Technischen Hochschule in Prag.)

(Eingegangen am 27. November 1924.)

Die Versuche wurden in derselben Weise ausgeführt, wie sie in den vorhergehenden Mitteilungen beschrieben worden sind[1]).

Harze.

Die Hartharze wurden in Pulverform angewandt und bedeckten das Keimbett in einer Menge von 5 bis 20 mg auf 1 qcm, die Weichharze oder Balsame mit rund 1 mm dicken Schichten, auf welchen die Samen zur Keimung gelangten. Bei den Balsamen wurde auch die Einwirkung ihrer Dämpfe allein auf die Keimung untersucht; die Versuchsanordnung war ähnlich wie bei den Dämpfen der ätherischen Öle, die Balsame befanden sich in einem Schälchen außerhalb des Keimbettes, so daß die Samen mit ihnen nicht in Berührung kamen, sondern nur unter dem Einfluß ihrer Dämpfe standen.

Benzoe von Styrax Benzoin Dryand.

Benzoe, Sumatra. In einer Menge von 20 mg Benzoepulver auf 1qcm des Keimbettes hat es die Keimungsenergie und die Keimprozente durchweg herabgesetzt, und zwar mit zunehmender Schwächung bei Wicken, Weizen und Raps. Das Stengelwachstum wurde bei allen Versuchsobjekten verzögert, die Wurzelbildung wesentlich geschädigt (I, 2). Enthielt das Keimbett nur 5 mg Benzoepulver pro 1 qcm, so wurden Keimungsenergie und Keimprozente viel weniger beeinflußt: das Wurzel- und Stengelwachstum, anfangs verzögert, erreichte schließlich eine nahezu normale Entwicklung (II, 2).

---

[1]) Diese Zeitschr. **62**, 299 u. 339; **146**, 389.

Canadabalsam von Abies balsamea Mill.

Canadabalsam in rund 1 mm dicker Schicht auf dem Keimbett hat die Keimungsenergie herabgesetzt, und zwar in zunehmender Reihenfolge bei Wicken, Weizen und Raps; die Keimprozente erreichten bei Wicken die Höhe des Kontrollversuchs, bei Weizen und noch mehr bei Raps waren sie sehr vermindert. Die Stengelbildung blieb sehr zurück, insbesondere bei Raps; die Wurzeln verkümmerten mehr oder weniger (III, 2). Die Dämpfe des Canadabalsams, 1 g auf 8037 ccm Luftraum und achttägiger Einwirkungsdauer, haben die Keimungsenergie nur minimal, die Keimprozente gar nicht vermindert. Das Stengelwachstum wurde verzögert, am meisten bei Weizen, weniger bei Wicken und am wenigsten bei Raps; die Wurzelbildung war allgemein geschwächt (IV, 3).

Copaivabalsam von Copaiferaarten.

Copaivabalsam, in rund 1 mm dicker Schicht auf dem Keimbett, verminderte sowohl die Keimungsenergie als auch die Keimprozente, zunehmend bei Wicken, Weizen und Raps. Das Wachstum der Wurzeln und Stengel blieb alsbald stationär, und schließlich verkümmerten beide (III, 3). In Dampfform hat Copaivabalsam, 1 g auf 8037 ccm Luftraum und achttägiger Einwirkungsdauer, den Keimungsprozeß viel weniger benachteiligt. Keimungsenergie und Keimprozente wurden unbedeutend vermindert, nur das Wachstum der Stengel und Wurzeln war mehr oder weniger verzögert (V, 3).

Guajakharz von Guajacum officinale L.

Guajakharz, 20 mg pro 1 qcm. Keimungsenergie und Keimprozente wurden bei Wicken und Weizen weniger, bei Raps stärker herabgesetzt. Die Stengel blieben in ihrer Entwicklung gegen den Kontrollversuch etwas zurück; die Wurzeln wurden relativ wenig benachteiligt und wiesen eine bläulichgrüne Färbung auf (I, 3). Bei Anwendung von 5 mg Guajakharzpulver pro 1 qcm wurde der Keimungsprozeß verhältnismäßig wenig beeinflußt (II, 3).

Gummigutt von Garcinia Morella Desr.

Bei Gummigutt wurde die bei den Farbstoffen angegebene Versuchsanordnung angewandt. Bei Anwendung von 3,3 Proz. Gummigutt in der Quellungsflüssigkeit ergab sich folgendes: Die Keimprozente erreichten die normale Höhe, die Keimungsenergie war nur bei Weizen etwas geschwächt; die Stengel blieben in ihrer Entwicklung nur wenig zurück, dagegen wurden die Wurzeln mehr oder weniger geschädigt, insbesondere bei Senf (IX, 10). Schwächere Konzentrationen (1- und 0,33proz.) waren ohne Einfluß auf die Keimungsenergie, die Keimprozente und das Stengelwachstum, nur die Wurzeln wurden benachteiligt (X, 8 und XI, 8).

Mastix von Pistacia lentiscus L.

Mastix hat bei Anwendung von 20 mg Mastixpulver pro 1 qcm die Keimungsenergie und die Keimprozente bei Wicken fast gar nicht beeinflußt, bei Weizen und insbesondere bei Raps aber herabgesetzt. Die Entwicklung der Stengel war ein wenig verzögert, die Wurzelbildung etwas geschädigt

(I, 4). In einer Menge von 5 mg Mastixpulver pro 1 qcm verlief die Keimung nahezu normal (II, 4).

Myrrhe von Balsamea Myrrha Engler.

Myrrhe, 20 mg auf 1 qcm, hat die Keimungsenergie und die Keimprozente herabgesetzt, relativ am wenigsten bei Wicken, mehr bei Weizen, und besonders stark bei Raps. Eine intensive Giftwirkung äußerte sich auf die Stengel- und Wurzelbildung (I, 5). In einer Menge von 5 mg Myrrhenpulver auf 1 qcm war die Wirkung eine wesentlich geringere, doch zeigte sich auch hier noch eine Verzögerung bzw. Schwächung des Keimungsprozesses (II, 5).

Perubalsam von Myroxylon Pereirae Kl.

Perubalsam, in einer rund 1 mm dicken Schicht, tötete sämtliche Keimlinge; keiner der Versuchssamen gelangte auch nur zur beginnenden Keimung (III, 4). In Dampfform, 1 g Perubalsam auf 8037 ccm Luftraum und achttägiger Einwirkungsdauer, dagegen wurde der Verlauf der Keimung kaum beeinflußt. Keimungsenergie und Keimprozente waren ungefähr wie beim Kontrollversuch; auch das Wachstum der Stengel und Wurzeln war nur wenig verzögert (V, 2).

Storax von Liquidambar orientalis Miller.

Storax bewirkte bei Anwendung von 20 mg auf 1 qcm eine wesentliche Verminderung der Keimungsenergie und der Keimprozente bei allen Versuchssamen, insbesondere bei Raps. Auch die Stengel- und Wurzelbildung wurde stark geschädigt, namentlich bei Raps (I, 6). Selbst 5 mg Storaxpulver auf 1 qcm affizierte nicht unwesentlich den Verlauf der Keimung (II, 6).

Terpentin, venetianischer, von Pinus Larix L.

Der venetianische Terpentin oder Lärchenterpentin äußerte auf den Verlauf der Keimung im allgemeinen eine ähnliche Wirkung wie der canadische Terpentin oder Canadabalsam bei denselben Versuchsbedingungen (III, 5). Auch in Dampfform wirkte der venetianische Terpentin unter sonst gleichen Bedingungen ähnlich wie die Dämpfe des Canadabalsams, doch war die Wirkung auf das Wachstum der Stengel und Wurzeln etwas geringer (IV, 2).

Tolubalsam von Toluifera balsamum L.

Tolubalsam, in rund 1 mm dicker Schicht, äußerte eine intensive Giftwirkung auf die Versuchssamen; Raps gelangte überhaupt nicht zur Keimung, von Wicken und Weizen keimten nur 3 bzw. 2 Proz., und die wenigen Keimpflänzchen verkümmerten alsbald (III, 6).

Weihrauch von Boswelliaarten.

Weihrauch, 20 mg pro 1 qcm, war fast ohne Einwirkung auf die Keimungsenergie und die Keimprozente der Wicken und des Weizens, dagegen wurden beide bei Raps sehr herabgesetzt. Die Entwicklung der Stengel wurde etwas verzögert, das Wurzelsystem geschädigt (I, 7). In einer Menge von 5 mg Weihrauchpulver auf 1 qcm wurde der Keimungs-

prozeß, bis auf eine Verminderung der Keimungsenergie und der Keimprozente bei Raps, nicht beeinflußt (II, 7).

Farbstoffe.

Es wurden die Rohfarbstoffe (Farbstoffhölzer) und die im Handel vorkommenden Farbstoffextrakte[1]) zu Versuchszwecken benutzt, und daher konnten auch hier keine äquimolekularen Lösungen zur Anwendung gelangen. Die Farbstoffhölzer wurden als Späne, geraspelt oder gemahlen verwendet. Die Versuchsanordnung war derart, daß die Rohfarbstoffe entweder direkt auf das Keimblatt gebracht wurden, darüber ein Blatt weißes Filtrierpapier gelegt wurde und die Samen auf letzterem zur Keimung gelangten; oder die Farbstoffe wurden vorher mit Wasser extrahiert und die Samen in die Farbstofflösung durch 24 Stunden zur Quellung aufgestellt; dann wurde dekantiert und die Samen mit den Farbstoffresten auf das Keimbett gebracht. Als Kontrollversuch wurde nicht nur Wasser allein benutzt, sondern auch ein keinen Farbstoff enthaltendes Holz in Form von Roßkastanienspänen, die aus entrindeten, 2 Jahre lufttrocken aufbewahrten Zweigen hergestellt wurden, und zwar in gleicher Menge und unter denselben Versuchsbedingungen, wie bei den Farbhölzern; außerdem wurde noch das einen Bitterstoff (Quassiin) enthaltende, käufliche Quassieholz von Quassia amara L. fil. zu Vergleichszwecken herangezogen. Roßkastanienholz hat den Verlauf des Keimungsprozesses fast gar nicht beeinflußt (VI, 2 und VII, 2). Quassiaholz (geraspelt) hat nur in größerer Konzentration (33,3 Proz. in der Befeuchtungsflüssigkeit) die Keimungsenergie bei Wicken und Raps, nicht aber bei Weizen herabgesetzt, ohne die Keimprozente und das Wachstum der Stengel und Wurzeln wesentlich zu benachteiligen (VI, 3 und VII, 3).

Alkanna von Alkanna tinctoria Tausch.

Alkannawurzelspäne haben bei einem Gehalt von 33,3 Proz. im Keimbett die Keimungsenergie und die Keimprozente der Versuchssamen herabgesetzt, insbesondere bei Raps, das Wachstum der Wurzeln und Stengel wurde sehr geschädigt (VI, 7). In einer Menge von 3,3 Proz. in der Quellungsflüssigkeit verlief der Keimungsprozeß bei allen Versuchssamen nahezu normal (VII, 7).

Alkannaextrakt, 3,3 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, setzte die Keimungsenergie und die Keimprozente der Wicken und des Weizens herab und verhinderte die Keimung der weißen Senfsamen; das Stengelwachstum blieb zurück und die Wurzeln wurden stark geschädigt (IX, 7).

---

[1]) Die Einwirkung der reinen, natürlichen und künstlichen Farbstoffe auf die Keimung, unter Berücksichtigung der Sorption wird den Gegenstand einer weiteren Untersuchung bilden.

Blauholz von Hämatoxylon Campechianum L.

Blauholzspäne, 33,3 Proz. im Keimbett, haben den Verlauf des Keimungsprozesses wesentlich geschädigt, weniger in bezug auf die Keimungsenergie und die Keimprozente als vielmehr in der Entwicklung der Wurzeln und Stengel (VI, 9). Bei einem Gehalt von 3,3 Proz. in der Quellungsflüssigkeit war die Schädigung eine geringere, nur das Wurzelsystem wurde stärker affiziert (VII, 9).

Blauholzextrakt hat in einer Konzentration von 3,3 Proz. in der Quellungsflüssigkeit die Keimprozente und die Keimungsenergie bei Wicken wenig, bei Weizen und Senf wesentlich herabgesetzt, das Wachstum der Stengel ziemlich verzögert und die Entwicklung der Wurzeln stark geschädigt (IX, 5). Enthielt die Quellungsflüssigkeit 1 Proz. Blauholzextrakt, so war die Schädigung eine schwächere (X, 5). Bei einem Gehalte von 0,33 Proz. Blauholzextrakt in der Quellungsflüssigkeit wurden die Keimprozente und die Keimungsenergie fast gar nicht beeinflußt, das Wachstum der Stengel ein wenig verzögert, die Wurzeln erschienen relativ am meisten benachteiligt (XI, 5).

Curcuma von Curcuma longa L.

Curcumapulver wirkte in einer Menge von 33,3 Proz. im Keimbett stark toxisch. Die Keimungsenergie und die Keimprozente waren stark herabgesetzt, die wenigen Keimpflänzchen verkümmerten alsbald (VI, 6). In einer Konzentration von 3,3 Proz. in der Quellungsflüssigkeit wurde die Keimungsenergie geschwächt, die Keimprozente aber nur unbedeutend vermindert; das Stengelwachstum war etwas verzögert, das Wurzelsystem dagegen stärker affiziert (VII, 6).

Gelbbeeren von Rhamnusarten.

Gelbbeeren (gemahlen) waren bei einer Konzentration von 33,3 Proz. im Keimbett äußerst giftig. Die Giftwirkung äußerte sich ebenso auf eine wesentliche Herabsetzung der Keimprozente als auch auf die Entwicklung der Wurzeln und Stengel, sämtliche Keimpflänzchen verkümmerten (VI, 10). In einer Menge von 3,3 Proz. in der Quellungsflüssigkeit dagegen konnte in den Keimprozenten und im Stengelwachstum keine wesentliche Schädigung beobachtet werden, nur das Wurzelsystem erschien beeinträchtigt (VII, 10).

Gelbholz von Morus tinctoria L.

Gelbholzspäne bewirkten in einer Konzentration von 33,3 Proz. im Keimbett eine Herabsetzung der Keimprozente und eine bedeutende Schädigung des Wurzel- und Stengelwachstums (VI, 5). 3,3 Proz. in der Quellungsflüssigkeit haben die Keimungsenergie, nicht aber die Keimprozente beeinflußt. Das Wurzelsystem hatte sehr gelitten, insbesondere bei Weizen und Senf, das Stengelwachstum war verzögert (VII, 5).

Gelbholzextrakt hat in einer Menge von 3,3 Proz. in der Quellungsflüssigkeit sowohl die Keimprozente als auch das Wachstum der Wurzeln und der Stengel in hohem Maße geschädigt (IX, 2). Auch eine 1 proz. Lösung von Gelbholzextrakt übte noch eine stark toxische Wirkung auf die Versuchsobjekte aus, die Keimungsenergie wurde wesentlich geschwächt, die Keimprozente erreichten nur bei Wicken nahezu die normale Höhe, bei Weizen und noch mehr bei Senf wurden sie sehr herabgesetzt; die Stengel blieben in ihrer Entwicklung zurück, insbesondere bei Senf, das

Wurzelsystem war durchweg stark angegriffen (X, 2). Erst eine 0,33 proz. Lösung übte eine geringere Giftwirkung auf den Verlauf der Keimung aus, Keimungsenergie, Keimprozente und Stengelbildung wurden bei Wicken und Weizen nur wenig, bei Senf stärker beeinflußt, die Wurzelbildung dagegen war bei allen Versuchssamen mehr oder weniger geschwächt (XI, 2).

Indigo von Indigoferaarten.

Indigotin, 3,3 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, hat die Keimungsenergie und die Keimprozente nur wenig vermindert, die Entwicklung der Wurzeln und Stengel war nahezu normal (IX, 9).

Krapp von Rubiaarten.

Krappwurzel (gemahlen) hat in einer Menge von 33,3 Proz. im Keimbett bei Wicken nur die Keimprozente, nicht aber die Keimungsenergie beeinflußt, bei Weizen und noch mehr bei Raps beide herabgesetzt; das Wachstum der Wurzeln und der Stengel war durchweg geschädigt (VI, 8). 3,3 Proz. in der Quellungsflüssigkeit waren ohne auffallenden Nachteil (VII, 8).

Lackmus von Flechtenarten.

Ein etwas feuchtes, nicht ganz geruchloses Lackmuspräparat hat in einer Menge von 3,3 Proz. in der Quellungsflüssigkeit den Keimungsprozeß stark geschädigt: Die Keimprozente und die Keimungsenergie wurden bei Weizen ziemlich, bei Wicken wesentlich herabgesetzt, die Senfsamen kamen überhaupt nicht zur Keimung, das Stengelwachstum war bei Weizen wenig, bei Wicken stärker verzögert, die Entwicklung der Wurzeln wurde wesentlich gehemmt (IX, 8). In Form eines lufttrockenen, geruchlosen Präparats war die Giftwirkung bei derselben Menge und unter denselben Versuchsbedingungen wie vorhin eine wesentlich geringere. Keimungsenergie und Keimprozente waren bei Weizen und Senf ungefähr wie beim Kontrollversuch, bei Wicken ein wenig schwächer; das Wurzel- und Stengelwachstum verlief nahezu normal. 1- und 0,33 proz. Lösungen des letzteren Präparats haben die Keimungsenergie herabgesetzt, die Keimprozente dagegen wenig beeinflußt; die Entwicklung der Stengel war dem Kontrollversuch nahezu gleich, das Wurzelsystem war etwas schwächer entwickelt (X, 7 und XI, 7).

Orseille von Flechtenarten.

Orseille, 3,3 Proz. in der Quellungsflüssigkeit: Keimprozente und Keimungsenergie waren bei Weizen fast wie beim Kontrollversuch, bei Wicken und Senf etwas vermindert; die Entwicklung der Stengel verlief ziemlich normal, das Wurzelsystem wurde wenig affiziert (IX, 6). 1- und 0,33 proz. Lösungen haben den Verlauf des Keimungsprozesses nur wenig beeinflußt (X, 6 und XI, 6).

Quercitron von Quercus tinctoria Willd.

Quercitronextrakt, 3,3 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, war in bezug auf Keimprozente und Keimungsenergie ohne wesentliche Wirkung auf Wicken und Weizen, nur bei Senf wurde insbesondere die Keimungsenergie geschwächt; das Stengelwachstum und die Wurzelbildung wurden etwas benachteiligt (IX, 3). Schwächere Lösungen, 1- und 0,33 proz. in der Quellflüssigkeit, waren nur von geringer Wirkung (X, 3 und XI, 3).

Rotholz von Caesalpiniaarten.

Rotholz (geraspelt) erwies sich in der Konzentration von 33,3 Proz. im Keimbett als ziemlich schädlich, weniger in bezug auf die Keimprozente und die Keimungsenergie, als in der Entwicklung der Wurzeln und Stengel, dabei wurde insbesondere Senf sehr geschädigt, geringer war die toxische Wirkung auf Wicken und Weizen (VI, 4). 3,3 Proz. Rotholz (geraspelt) in der Quellungsflüssigkeit hat die Wicken- und Weizenkeimlinge nur wenig beeinflußt, der Keimungsprozeß verlief nahezu normal. Dagegen wurden bei Senf sowohl die Keimungsenergie als auch die Keimprozente vermindert, das Wachstum der Stengel und Wurzeln erschien sehr geschädigt, die Keimpflänzchen verkümmerten alsbald (VII, 4).

Rotholzextrakt, 3,3 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, erwies sich durchweg als sehr schädlich, die Keimungsenergie und die Keimprozente wurden herabgesetzt, die Entwicklung der Stengel stark affiziert, die Wurzeln blieben in ihrem Wachstum sehr zurück und verkümmerten schließlich (IX, 4). In einer Konzentration von 1 Proz. Rotholzextrakt wurden bei Wicken und Weizen die Keimungsenergie, nicht aber die Keimprozente beeinflußt, bei Senf dagegen wurden beide herabgesetzt, das Stengelwachstum war verzögert und die Entwicklung der Wurzeln benachteiligt (X, 4). 0,33 Proz. Rotholzextrakt hat die Keimprozente fast gar nicht, die Keimungsenergie nur wenig geschwächt, auch das Wachstum der Stengel war nur in geringerem Maße verzögert, etwas größer war die Beeinträchtigung der Wurzeln (XI, 4).

Saflor von Carthamus tinctorius L.

Saflor, 3,3 Proz. in der Quellungsflüssigkeit: Die Keimprozente erreichten bei Wicken und Weizen die normale Höhe, dagegen wurde die Keimungsenergie vermindert; bei Senf wurde die Keimungsenergie stark geschwächt, die Keimprozente blieben gegen die des Kontrollversuchs etwas zurück. Das Wachstum der Wurzeln und der Stengel wurde bei Wicken und Weizen verzögert, bei Senf stark geschädigt (VIII, 2).

Rotes Sandelholz von Pterocarpus santalinus L. fil.

Sandelholz, 3,3 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, setzte die Keimungsenergie bei Wicken und Weizen etwas, bei Senf wesentlich herab, die Keimprozente wurden weniger beeinflußt; die Entwicklung der Stengel war bei Wicken nahezu normal, bei Weizen verzögert, die Senfstengel verkümmerten in kurzer Zeit, das Wurzelsystem wurde ziemlich stark geschädigt, am meisten bei Senf (VIII, 3).

Waid von Isatis tinctoria L.

3,3 Proz. Waid in der Quellungsflüssigkeit hat die Keimungsenergie der Versuchsobjekte herabgesetzt, und zwar am meisten bei Senf, weniger bei Wicken und am wenigsten bei Weizen; die Keimprozente wurden wenig beeinflußt und erreichten am siebenten Versuchstage nahezu die des Kontrollversuchs. Wurzel- und Stengelwachstum, anfangs etwas verzögert, näherten sich später mehr und mehr der normalen Entwicklung (VIII, 5).

Wau von Reseda luteola L.

Wau, 3,3 Proz. in der Quellungsflüssigkeit, setzte die Keimungsenergie in zunehmender Reihenfolge bei Weizen, Wicken und Senf herab;

die Keimprozente wurden bei Wicken und Weizen gar nicht, bei Senf ein wenig vermindert. Die Entwicklung der Wurzeln und Stengel blieb in den ersten Versuchstagen gegen den Kontrollversuch zurück, war aber am Schluß der Versuchszeit demselben nahezu gleich (VIII, 4).

Zusammenfassung.

Harze.

Benzoe (Sumatra) war in größerer Menge (20 mg Benzoepulver auf 1 qcm des Keimbettes) schädlich, in geringerer Menge (5 mg pro 1 qcm) wenig nachteilig.

Canadabalsam oder kanadischer Terpentin (in rund 1 mm dicker Schicht im Keimbett) schädigte den Keimungsprozeß wesentlich, ähnlich wirkte auch venetianischer Terpentin oder Lärchenterpentin. Die Dämpfe der beiden Terpentine haben die Keimung weniger geschädigt, die Wirkungen waren ähnlich, aber bei venetianischem Terpentin minder nachteilig.

Copaivabalsam wirkte im Keimbett (1 mm) stark toxisch, seine Dämpfe haben den Keimungsprozeß viel weniger benachteiligt.

Guajakharz war verhältnismäßig wenig schädlich.

Gummigutt hat in größerer Menge (3,3 Proz.) den Verlauf des Keimungsprozesses beeinträchtigt, geringere Mengen (1 und 0,33 Proz.) haben nur die Entwicklung der Wurzeln benachteiligt.

Mastix war nur in größerer Menge (20 mg auf 1 qcm) nachteilig, in geringerer Menge (5 mg pro 1 qcm) hat er die Keimung nicht wesentlich beeinflußt.

Myrrhe wirkte in größerer Menge (20 mg pro 1 qcm) stark toxisch, aber auch geringere Mengen (5 mg pro 1 qcm) benachteiligten noch die Keimung.

Perubalsam verhinderte im Keimbett (1 mm) die Keimung sämtlicher Versuchssamen; seine Dämpfe dagegen beeinflußten die Keimung nur wenig.

Storax äußerte eine starke Giftwirkung, selbst geringe Mengen schädigten noch den Keimungsprozeß.

Tolubalsam in einer rund 1 mm dicken Schicht im Keimbett wirkte tödlich auf fast alle Keimlinge.

Weihrauch war nur in größerer Menge (20 mg pro 1 qcm) nachteilig, geringere Mengen (5 mg pro 1 qcm) haben den Keimungsprozeß nur wenig beeinflußt.

Farbstoffe.

Alkanna. Alkannawurzelspäne schädigten nur in größerer Menge (33,3 Proz.) den Keimungsprozeß, geringere Mengen (3,3 Proz.) dagegen haben den Verlauf der Keimung fast gar nicht beeinflußt. Alkannaextrakt wirkte auch in einer Menge von 3,3 Proz. stark toxisch auf die Keimung ein.

Blauholz war sowohl in Form von Spänen als auch als Extrakt unter sonst gleichen Bedingungen wesentlich schädlicher als Alkanna. Selbst eine Menge von 0,33 Proz. Blauholzextrakt benachteiligte noch den Keimungsprozeß, namentlich die Wurzeln.

Curcumapulver wirkte in einer Menge von 33,3 Proz. tödlich auf die Keimlinge, auch 3,3 Proz. schädigten noch die Keimung, insbesondere die Entwicklung der Wurzeln.

Gelbbeeren (gemahlen) äußerten bei denselben Mengen und denselben Versuchsbedingungen ungefähr die gleichen Wirkungen wie Curcumapulver.

Gelbholz erwies sich sowohl in Form seiner Späne als auch als Extrakt als ein heftiges Gift für den Keimling. Selbst schwächere Lösungen, 3,3 Proz. Späne und 0,33 Proz. Extrakt, schädigten noch die Keimung, namentlich das Wurzelsystem.

Indigotin (3,3 Proz.) war nahezu ohne Nachteil für die Keimung.

Krappwurzel (gemahlen) schädigte nur in größerer Menge (33,3 Proz.) die Keimung; 3,3 Proz. waren ohne auffallenden Nachteil.

Lackmus. Unreines käufliches Lackmus wirkte in einer Menge von 3,3 Proz. stark toxisch auf die Versuchssamen ein. Reine Lackmuspräparate haben bei derselben Menge und denselben Versuchsbedingungen eine wesentlich geringere Giftwirkung ausgeübt; 1 und 0,33 Proz. waren bis auf die Entwicklung der Wurzeln fast ohne Nachteil.

Orseille erwies sich als wenig schädlich für die Keimung der Versuchssamen.

Quercitron hat den Verlauf des Keimungsprozesses nur in geringem Grade benachteiligt.

Rotholz (geraspelt) hat in einer Menge von 33,3 Proz. insbesondere die weißen Senfsamen stark geschädigt, Wicken und Weizen wurden weniger benachteiligt, auch 3,3 Proz. haben noch die Senfsamen sehr benachteiligt, während Wicken und Weizen nahezu normal keimten. Ähnlich war die Wirkung von Rotholzextrakt, 3,3 und 1 Proz. beeinträchtigten wesentlich den Verlauf der Keimung; erst 0,33 Proz. waren von geringerer Wirkung.

Saflor, 3,3 Proz., hat insbesondere die weißen Senfsamen stark geschädigt, bei Wicken und Weizen war die Wirkung eine schwächere.

Rotes Sandelholz, 3,3 Proz., äußerte auf die Keimung der Wicken eine relativ geringe, bei Weizen eine stärkere und bei Senf eine stark toxische Wirkung; das Wurzelsystem wurde bei allen Versuchssamen mehr oder weniger geschädigt.

Waid und Wau, je 3,3 Proz., waren von geringer Wirkung und haben den Keimungsprozeß verhältnismäßig nur wenig benachteiligt.

Bei fast allen Farbstoffen wurde insbesondere die Entwicklung der Wurzeln mehr oder weniger affiziert.

Tabellen.

W bedeutet Wurzel, S Stengel, Sp Spuren, v verkümmert.
Die Messungsresultate sind in Millimetern ausgedrückt.

I. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 30. September bis 18. Oktober.
Zimmertemperatur: 13 bis 16° R.

20 mg Harzpulver auf 1 qcm des Keimbettes	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	87	W 3—7, S 0—Sp	81	W 2—8, S 0—2	70	—
2. Benzoe	61	2—4, 0	38	1—5, 0—1	13	—
3. Guajak	80	2—7, 0—Sp	63	1—6, 0—1	40	—
4. Mastix	85	2—8, 0—Sp	74	2—7, 0—2	43	—
5. Myrrhe	50	1—6, 0—Sp	33	1—4, 0—1	6	—
6. Storax	39	1—3, 0	28	1—3, 0—1	6	—
7. Weihrauch	83	2—6, 0—Sp	80	1—4, 0—1	23	—
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	90	W 7—13, S 2—5	84	W 10—19, S 2—7	80	—
2. Benzoe	70	3—10, 0—3	55	3—10, 2—4	15	—
3. Guajak	82	6—14, 2—4	71	3—8, 2—4	44	—
4. Mastix	86	8—15, 2—4	84	9—19, 2—5	53	—
5. Myrrhe	70	2—10, 0—2	45	2—6, 1—6	9	—
6. Storax	40	1—6, 0—2	32	2—6, 1—4	7	—
7. Weihrauch	87	4—10, 0—3	82	2—9, 1—4	37	—
Am 5. Versuchstage:						
1. Wasser	92	W 16—25, S 5—8	88	W 18—30, S 11—17	86	—
2. Benzoe	80	4—12, Sp—6	56	5—12, 5—10	17	—
3. Guajak	83	15—25, 5—7	77	7—13, 6—10	53	—
4. Mastix	90	16—26, 5—8	88	9—17, 6—11	62	—
5. Myrrhe	76	3—10, 0—3	47	3—8, 2—6	11	—
6. Storax	46	1—6, 0—3	34	2—7, 1—5	9	—
7. Weihrauch	90	13—23, 3—6	85	7—14, 4—10	29	—
Am 6. Versuchstage:						
1. Wasser	94	W 23—38, S 7—11	89	W 25—42, S 16—30	90	S 9—15
2. Benzoe	82	4—12, 2—8	57	6—17, 9—19	19	5—10
3. Guajak	87	22—37, 6—9	84	8—19, 10—18	55	6—11
4. Mastix	90	23—39, 6—11	88	15—30, 12—25	66	7—12
5. Myrrhe	80	3—11, 0—4	48	3—9, 4—9	11	0
6. Storax	46	1—7, 0—4	34	3—9, 5—10	10	0
7. Weihrauch	90	20—35, 5—10	87	10—21, 10—20	31	0
Am 7. Versuchstage:						
1. Wasser	94	W 30—48, S 10—16	89	W 32—55, S 32—50	91	S 11—19
2. Benzoe	82	5—12, 3—10	57	8—20, 12—26	19	6—11
3. Guajak	87	29—48, 8—13	85	10—25, 18—27	55	7—14
4. Mastix	90	30—49, 7—13	88	22—45, 20—45	68	9—16
5. Myrrhe	80	3—12, 0—6	48	3—9, 7—17	12	0—2
6. Storax	46	1—8, 0—5	35	3—9, 7—13	10	0
7. Weihrauch	90	25—40, 7—13	87	17—30, 19—34	33	6—11
Am 8. Versuchstage:						
1. Wasser	94	W 40—60, S 15—22	90	S 50—66	91	S 13—23
2. Benzoe	82	5—13, 5—16	57	19—35	19	7—15
3. Guajak	87	40—64, 12—20	86	30—43	55	9—19

I. Versuchsreihe (Fortsetzung).

20 mg Harzpulver auf 1 qcm des Keimbettes	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
4. Mastix	91	W40–62, S 9–18	88	S 30—55	70	S 11—20
5. Myrrhe	80	3–12, 0– 8	48	9—23	12	0— 4
6. Storax	46	1– 8, 0– 8	35	8—18	10	0— 2
7. Weihrauch	90	30–45, 11–19	88	24—41	33	7—13
Am 9. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 20—32	—	S 65—85	—	S 19—30
2. Benzoe	—	11—25	—	30—60	—	10—23
3. Guajak	—	18—32	—	35—56	—	17—28
4. Mastix	—	15—17	—	35—65	—	17—28
5. Myrrhe	—	3—12	—	11—25	—	2— 6
6. Storax	—	1—13	—	10—23	—	2— 7
7. Weihrauch	—	18—30	—	30—60	—	11—23
Am 11. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 40—60	—	S 85—115	—	S 28—43
2. Benzoe	—	30—50	—	60— 90	—	20—40
3. Guajak	—	35—55	—	65— 90	—	20—40
4. Mastix	—	30—50	—	62— 96	—	28—42
5. Myrrhe	—	4—20	—	20— 50	—	3— 7
6. Storax	—	3—30	—	25— 50	—	3— 8
7. Weihrauch	—	35—55	—	65— 90	—	25—40
Am 13. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 63—85	—	S 110—140	—	S 35—50
2. Benzoe	—	40—60	—	80—120	—	30—47
3. Guajak	—	50—70	—	80—120	—	30—48
4. Mastix	—	50—75	—	85—125	—	32—49
5. Myrrhe	—	5—25	—	25— 70	—	3— 8
6. Storax	—	30—60	—	45— 85	—	3— 9
7. Weihrauch	—	50—80	—	85—125	—	30—48
Am 15. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 75—115	—	S 130—150	—	S 40—55
2. Benzoe	—	60— 90	—	105—130	—	35—50
3. Guajak	—	65—100	—	100—125	—	35—52
4. Mastix	—	65—105	—	90—130	—	38—52
5. Myrrhe	—	6— 30	—	30— 75	—	3— 9
6. Storax	—	40— 70	—	50— 90	—	3—10
7. Weihrauch	—	60—100	—	110—145	—	35—55
Am 18. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 100—140	—	S 140—160	—	S 45—60
2. Benzoe	—	80—120	—	110—145	—	40—55
3. Guajak	—	90—130	—	120—155	—	40—60
4. Mastix	—	90—130	—	115—158	—	42—60
5. Myrrhe	—	7— 31	—	30— 75	—	3— 9
6. Storax	—	60— 90	—	60—100	—	3—10
7. Weihrauch	—	80—120	—	120—156	—	40—60

Das Wachstum der Wurzeln war im Vergleich zum Kontrollversuch mehr oder weniger geschädigt. Relativ am geringsten äußerte sich die schädliche Wirkung bei Guajak, die Wurzeln wiesen hier eine bläulichgrüne Färbung auf, und bei Mastix; dann folgten mit zunehmender Schädigung Weihrauch und Benzoe. Am meisten benachteiligt war das Wurzelsystem bei Storax und namentlich bei Myrrhe.

II. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 18. Oktober bis 12. November.
Zimmertemperatur: 12 bis 16° R.

5 mg Harzpulver auf 1 qcm des Keimbettes	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	89	W3—7, S0—Sp	83	W2—7, S0—2	80	—
2. Benzoe	77	2—5, 0—Sp	65	1—5, 0—1	64	—
3. Guajak	87	2—6, 0—Sp	75	1—5, 0—1	66	—
4. Mastix	88	3—7, 0—Sp	81	2—6, 0—2	70	—
5. Myrrhe	70	2—6, 0—Sp	65	1—4, 0—1	56	—
6. Storax	69	1—4, 0	70	1—3, 0—1	28	—
7. Weihrauch . .	88	2—6, 0—Sp	81	1—5, 0—2	50	—
Am 5. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W12—20, S3—6	89	W15—26, S6—11	86	—
2. Benzoe	83	7—13, 2—5	77	10—20, 3—6	83	—
3. Guajak	87	10—20, 2—6	83	10—18, 5—9	72	—
4. Mastix	93	12—20, 3—6	84	10—22, 4—10	78	—
5. Myrrhe	79	7—16, Sp—4	71	5—13, 2—6	76	—
6. Storax	78	3— 7, Sp—3	78	8—12, 2—6	55	—
7. Weihrauch . .	89	10—20, 2—6	87	10—17, 3—7	62	—
Am 6. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W15—30, S6—10	90	W23–38, S12–21	87	S 8—13
2. Benzoe	83	10—20, 3— 6	77	16–30, 10–15	83	5—11
3. Guajak	87	12—25, 5— 9	83	13–23, 10–20	80	5—10
4. Mastix	93	15—25, 6— 9	84	15–28, 10–20	80	6—12
5. Myrrhe	81	9—29, 2— 5	75	7–15, 6–12	78	2— 7
6. Storax	78	5—10, 2— 5	79	8–15, 6–12	65	2— 6
7. Weihrauch . .	89	14—30, 5—10	88	15–25, 10–20	70	5—11
Am 7. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W25–40, S10–15	91	W30–52, S25–35	88	S 10—18
2. Benzoe	83	16–36, 8–12	77	20–45, 18–28	83	8—16
3. Guajak	87	22–43, 9–15	84	15–28, 15–25	80	8—14
4. Mastix	93	25–40, 9–15	85	20–44, 16–28	81	9—17
5. Myrrhe	83	11–22, 2– 7	75	8–17, 12–20	79	3—10
6. Storax	79	9–20, 3– 8	79	10–20, 13–24	65	4—12
7. Weihrauch . .	89	20–40, 7–15	88	25–47, 19–31	73	9—18
Am 8. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W30–50, S15–23	91	S 40—56	90	S 14—22
2. Benzoe	83	23–45, 11–20	77	30—45	83	13—22
3. Guajak	87	28–54, 14–21	85	26—38	82	13—20
4. Mastix	93	30–51, 14–23	86	30—45	82	14—21
5. Myrrhe	83	12–25, 3–10	75	23—32	79	4—12
6. Storax	79	10–24, 5–14	79	26—40	67	5—17
7. Weihrauch . .	89	26–50, 10–24	88	32—48	73	13—22
Am 10. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 38—55	—	S 70—95	—	S 30—45
2. Benzoe	—	26—50	—	50—80	—	30—47
3. Guajak	—	30—50	—	48—73	—	30—44
4. Mastix	—	32—57	—	50—78	—	30—46
5. Myrrhe	—	12—30	—	40—65	—	10—30
6. Storax	—	20—40	—	50—76	—	15—40
7. Weihrauch . .	—	33—55	—	56—90	—	30—44

II. Versuchsreihe (Fortsetzung).

5 mg Harzpulver auf 1 qcm des Keimbettes	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 12. Versuchstage:	.					
1. Wasser	—	S 60—80	—	S 95—120	—	S 35—50
2. Benzoe	—	48—80	—	75—110	—	36—53
3. Guajak	—	50—80	—	70—105	—	35—50
4. Mastix	—	50—85	—	75—108	—	35—50
5. Myrrhe	—	20—46	—	65— 92	—	20—40
6. Storax	—	40—55	—	75—106	—	25—45
7. Weihrauch . .	—	50—80	—	80—112	—	34—50
Am 15. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 90—116	—	S 115—155	—	S 46—60
2. Benzoe	—	85—112	—	105—145	—	46—64
3. Guajak	—	86—115	—	100—140	—	45—60
4. Mastix	—	85—120	—	103—140	—	44—60
5. Myrrhe	—	40— 80	—	97—130	—	27—48
6. Storax	—	57— 90	—	106—145	—	34—52
7. Weihrauch . .	—	85—120	—	110—150	—	44—60
Am 18. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 110—155	—	S 120—165	—	S 50—63
2. Benzoe	—	108—153	—	115—160	—	50—68
3. Guajak	—	108—154	—	110—157	—	50—63
4. Mastix	—	110—160	—	110—155	—	50—64
5. Myrrhe	—	65—105	—	108—140	—	35—50
6. Storax	—	85—120	—	114—154	—	40—55
7. Weihrauch . .	—	110—160	—	120—165	—	50—65
Am 24. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 140—200	—	S 160—215	—	S 60—80
2. Benzoe	—	135—200	—	150—210	—	60—85
3. Guajak	—	135—200	—	145—200	—	60—75
4. Mastix	—	140—206	—	160—212	—	60—78
5. Myrrhe	—	100—150	—	155—190	—	40—55
6. Storax	—	125—180	—	155—200	—	55—72
7. Weihrauch . .	—	140—205	—	160—215	—	60—83

Das Wurzelsystem war bei Benzoe, Guajak, Mastix und Weihrauch relativ gut entwickelt und ungefähr gleich, viel schwächer bei Storax und insbesondere bei Myrrhe.

III. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 18. September bis 9. Oktober.
Zimmertemperatur: 13 bis 15° R.

Die Balsame bedeckten das Keimbett mit einer rund 1 mm dicken Schicht	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	88	W 1—6, S 0	79	W 1—5, S 5—2	68	—
2. Canadabalsam .	54	1—5, 0	45	Sp—2, 0—1	12	—
3. Copaivabalsam	56	Sp—4, 0	23	Sp—1, 0	8	—
4. Perubalsam . .	0	— —	0	— —	0	—
5. Terpentin, ven.	62	1—6, 0	52	Sp—2, 0—1	13	—
6. Tolubalsam . .	2	Sp 0	2	Sp 0	0	—

III. Versuchsreihe (Fortsetzung).

Die Balsame bedeckten das Keimbett mit einer rund 1 mm dicken Schicht	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W5—10, SSp—2	89	W6—12, S 2—5	80	—
2. Canadabalsam .	88	2— 9, 0—2	52	Sp— 6, 0—3	12	—
3. Copaivabalsam	56	Sp— 5, 0	23	Sp— 1, 0	15	—
4. Perubalsam . .	0	— —	0	— —	0	—
5. Terpentin, ven.	75	1— 9, 0—Sp	52	Sp— 5, 0—3	14	—
6. Tolubalsam . .	3	Sp— 2, 0	2	v 0—3	0	—
Am 5. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W10—19, S2—5	90	W11—21, S5—9	85	—
2. Canadabalsam .	88	3—11, 0—4	53	3— 7, 2—7	12	—
3. Copaivabalsam	56	Sp— 5, 0	23	Sp— 6, 0—3	15	—
4. Perubalsam . .	0	— —	0	— —	0	—
5. Terpentin, ven.	86	1—13, 0—3	52	2— 6, 2—5	14	—
6. Tolubalsam . .	3	v	2	v	0	—
Am 7. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W25—35, S9—13	90	S 25—36	90	S 8—17
2. Canadabalsam .	91	5—12, Sp— 7	53	9—17	12	v
3. Copaivabalsam	56	v 0	23	0— 3	15	v
4. Perubalsam . .	0	— —	0	—	0	—
5. Terpentin, ven.	90	2—11, 0— 7	52	8—18	14	v
6. Tolubalsam . .	3	v	2	v	0	—
Am 9. Versuchstage:						
1. Wasser	91	S 20—32	90	S 55—75	90	S 20—30
2. Canadabalsam .	91	5—15	53	10—28	12	v
3. Copaivabalsam	56	v	23	v	15	v
4. Perubalsam . .	0	—	0	—	0	—
5. Terpentin, ven.	90	5—15	52	10—29	14	v
6. Tolubalsam . .	3	v	2	v	0	—
Am 11. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 40—60	—	S 80—100	—	S 30—50
2. Canadabalsam .	—	15—35	—	23— 44	—	v
3. Copaivabalsam	—	v	—	v	—	v
4. Perubalsam . .	—	—	—	—	—	—
5. Terpentin, ven.	—	14—33	—	22—45	—	v
6. Tolubalsam . .	—	v	—	v	—	—
Am 14. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 60—90	—	S 120—150	—	S 38—59
2. Canadabalsam .	—	30—60	—	40—77	—	v
3. Copaivabalsam	—	v	—	v	—	v
4. Perubalsam . .	—	—	—	—	—	—
5. Terpentin, ven.	—	30—57	—	40—78	—	v
6. Tolubalsam . .	—	v	—	v	—	—
Am 17. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 90—120	—	S 130—160	—	S 47—68
2. Canadabalsam .	—	50—100	—	65—90	—	v
3. Copaivabalsam	—	v	—	v	—	v
4. Perubalsam . .	—	—	—	—	—	—
5. Terpentin, ven.	—	50—75	—	65—90	—	v
6. Tolubalsam . .	—	v	—	v	—	—

III. Versuchsreihe (Fortsetzung).

Die Balsame bedecken das Keimbett mit einer rund 1 mm dicken Schicht	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 21. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 115—155	—	S 145—190	—	S 53—68
2. Canadabalsam .	—	66—120	—	65—130	—	v
3. Copaivabalsam	—	v	—	v	—	v
4. Perubalsam . .	—	—	—	—	—	—
5. Terpentin, ven. .	—	65—120	—	62—120	—	v
6. Tolubalsam . .	—	v	—	v	—	—

Die Wurzeln wurden in ihrer Entwicklung durchweg stark geschädigt, relativ am wenigstens bei Canadabalsam und venetianischem Terpentin, aber auch hier verkümmerten sie mehr oder weniger; am intensivsten war die Schädigung bei Copaivabalsam und noch mehr bei Tolubalsam, bei Perubalsam kam es überhaupt zu keiner Wurzelbildung.

IV. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 24. April bis 8. Mai.
Zimmertemperatur: 11 bis 16° R.
Einwirkungsdauer der Dämpfe: 8 Tage.

1 g auf 8037 ccm Luftraum	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Weißer Senf
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	77	WSp—10, S0—2	93	WSp—11, S0—7	89	—
2. Terpentin, ven.	72	Sp— 9, 0—2	93	Sp— 6, 0—5	88	—
3. Canadabalsam .	76	Sp— 9, 0—2	91	Sp— 2, 0—3	83	—
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	90	W11—22, S2—6	94	S 12—25	94	S 6—14
2. Terpentin, ven.	88	9—20, 2—5	94	8—18	93	5—12
3. Canadabalsam .	91	10—20, 2—5	94	3— 6	88	5—10
Am 5. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W20—31, S6—13	95	S 28—48	95	S 15—23
2. Terpentin, ven.	89	14—28, 3—12	95	25—40	94	13—22
3. Canadabalsam .	92	15—28, 4—13	95	9—14	93	12—23
Am 7. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 16—36	—	S 60—100	—	S 20—35
2. Terpentin, ven.	—	11—27	—	51— 77	—	18—35
3. Canadabalsam .	—	11—26	—	28— 48	—	17—34
Am 9. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 30—50	—	S 85—140	—	S 26—47
2. Terpentin, ven.	—	22—38	—	80—120	—	22—46
3. Canadabalsam .	—	15—34	—	55— 88	—	20—45
Am 11. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 45—65	—	S 100—160	—	S 33—52
2. Terpentin, ven.	—	33—60	—	90—142	—	28—50
3. Canadabalsam .	—	30—55	—	63—105	—	27—50

Die Wurzeln waren bei Terpentin nahezu wie beim Kontrollversuch, bei Canadabalsam etwas schwächer, insbesondere wiesen die Wurzeln des Weizens eine größere Schädigung auf.

V. Versuchsreihe. Jahreszeit und Versuchsdauer: 24. April bis 8. Mai.
Zimmertemperatur: 11 bis 16° R.
Einwirkungsdauer der Dämpfe: 8 Tage.

1 g auf 8037 ccm Luftraum	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Weißer Senf
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	77	WSp—10, S0—2	93	WSp—11, S0—7	89	—
2. Perubalsam . .	75	Sp—10, 0—2	91	Sp—11, 0—6	89	—
3. Copaivabalsam	77	Sp— 9, 0—2	89	Sp—11, 0—6	91	—
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	90	W11—22, S2—6	94	S 15—25	94	S 6—14
2. Perubalsam . .	89	10—21, 2—5	93	10—24	91	6—14
3. Copaivabalsam	81	10—21, 2—5	93	8—20	92	5—12
Am 5. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W20—31, S6—13	95	S 28—48	95	S 15—23
2. Perubalsam . .	90	15—30, 3—12	94	27—49	92	14—23
3. Copaivabalsam	85	15—29, 3—12	94	26—45	92	14—23
Am 7. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 16—36	—	S 60—100	—	S 20—35
2. Perubalsam . .	—	12—30	—	55— 95	—	20—35
3. Copaivabalsam	—	12—28	—	52— 80	—	18—34
Am 9. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 30—50	—	S 85—140	—	S 26—47
2. Perubalsam . .	—	25—35	—	80—130	—	26—48
3. Copaivabalsam	—	20—30	—	70—120	—	24—40
Am 11. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 45—65	—	S 100—160	—	S 33—52
2. Perubalsam . .	—	40—57	—	93—148	—	32—52
3. Copaivabalsam	—	30—40	—	75—128	—	28—45

Das Wurzelsystem war bei Perubalsam wenig, bei Copaivabalsam stärker beeinflußt.

VI. Versuchsreihe. Jahreszeit und Versuchsdauer: 17. bis 30. März.
Zimmertemperatur: 8 bis 16° R.

Das Keimbett enthielt 33,3 Proz. Rohfarbstoffe	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
Am 2. Versuchstage:						
1. Wasser	80	W2— 9, S0—Sp	80	W 4—9, S 0—3	84	—
2. Roßkastanienholz .	80	2— 9, 0—Sp	81	4—8, 0—3	80	—
3. Quassiaholz . .	53	2— 8, 0—Sp	80	3—7, 0—2	54	—
4. Rotholz	77	1— 9, 0—Sp	75	2—7, 0—2	80	—
5. Gelbholz . . .	75	2— 7, 0—Sp	54	2—4, 0—1	50	—
6. Curcuma . . .	4	1— 2, 0	6	1—2, 0	3	—
7. Alkanna	67	1— 7, 0—Sp	56	2—5, 0—2	21	—
8. Krapp	47	1— 5, 0	43	2—5, 0—1	17	—
9. Blauholz . . .	80	3—10, 0—Sp	66	2—6, 0—2	80	—
10. Gelbbeeren . .	6	1— 3, 0	15	1—3, 0	0	—
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	84	W8—15, SSp—4	89	S 2—9	87	—
2. Roßkastanienholz .	85	7—16, Sp—4	89	2—8	86	—

VI. Versuchsreihe (Fortsetzung).

Das Keimbett enthielt 33,3 Proz. Rohfarbstoffe	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Raps
3. Quassiaholz	58	W5—14, SSp—3	88	S 0—5	65	—
4. Rotholz	79	6—14, Sp—3	76	0—4	81	—
5. Gelbholz	77	4—12, Sp—2	69	0—3	67	—
6. Curcuma	18	v 0	10	0—2	3	—
7. Alkanna	68	1—10, 0—2	58	0—5	22	—
8. Krapp	80	2—10, 0—2	57	0—5	30	—
9. Blauholz	83	6—15, Sp—2	68	0—4	81	—
10. Gelbbeeren	24	v v	19	v	20	—
Am 5. Versuchstage:						
1. Wasser	89	S 7—17	90	S 16—45	88	S 17—30
2. Roßkastanienholz	90	7—16	90	17—46	87	16—25
3. Quassiaholz	85	6—14	89	10—26	86	12—23
4. Rotholz	84	Sp—5	78	2—15	82	2—6
5. Gelbholz	78	Sp—8	71	0—6	68	2—10
6. Curcuma	18	0	10	1—6	3	v
7. Alkanna	69	Sp—7	80	0—15	34	2—7
8. Krapp	90	Sp—8	63	6—30	30	2—10
9. Blauholz	84	Sp—7	72	0—6	81	2—9
10. Gelbbeeren	34	0—Sp	21	3—6	20	v
Am 7. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 18—30	—	S 60—90	—	S 25—44
2. Roßkastanienholz	—	18—19	—	58—80	—	22—45
3. Quassiaholz	—	17—29	—	50—75	—	20—45
4. Rotholz	—	Sp—16	—	10—36	—	5—12
5. Gelbholz	—	Sp—13	—	5—20	—	4—11
6. Curcuma	—	0	—	5—17	—	v
7. Alkanna	—	2—16	—	10—37	—	5—20
8. Krapp	—	6—17	—	30—62	—	9—36
9. Blauholz	—	Sp—10	—	5—15	—	6—11
10. Gelbbeeren	—	Sp—9	—	8—15	—	v
Am 10. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 40—76	—	S 96—150	—	S 38—64
2. Roßkastanienholz	—	40—75	—	90—146	—	35—63
3. Quassiaholz	—	35—70	—	86—148	—	35—64
4. Rotholz	—	10—34	—	26—90	—	v
5. Gelbholz	—	2—22	—	8—46	—	v
6. Curcuma	—	0	—	5—30	—	v
7. Alkanna	—	10—40	—	25—95	—	16—40
8. Krapp	—	20—55	—	63—140	—	25—60
9. Blauholz	—	2—18	—	7—40	—	v
10. Gelbbeeren	—	5—15	—	9—25	—	v
Am 12. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 60—104	—	S 105—173	—	S 45—72
2. Roßkastanienholz	—	60—105	—	100—162	—	42—66
3. Quassiaholz	—	57—103	—	98—168	—	43—70
4. Rotholz	—	15—63	—	33—107	—	v
5. Gelbholz	—	3—26	—	9—60	—	v
6. Curcuma	—	0	—	v	—	v
7. Alkanna	—	15—70	—	34—117	—	25—54
8. Krapp	—	35—82	—	78—157	—	30—63
9. Blauholz	—	2—22	—	8—60	—	v
10. Gelbbeeren	—	v	—	v	—	v

Das Wurzelsystem war beim Roßkastanien- und Quassiaholz dem Kontrollversuch ungefähr gleich, schwächer entwickelt war es bei Krapp, noch mehr geschwächt bei Alkanna und Rotholz; dann folgten mit zunehmender Schädigung Blauholz und Gelbholz, am meisten geschädigt erschienen die Wurzeln bei Gelbbeeren und Curcuma.

VII. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 1. bis 14. April.
Zimmertemperatur: 8 bis 16° R.

Die Quellungsflüssigkeit enthielt 3,3 Proz. Rohfarbstoffe	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Weißer Senf
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	86	WSp–10, S0–Sp	95	WSp—10, S0—3	85	—
2. Roßkastanienholz	85	Sp– 9, 0–Sp	93	Sp— 8, 0—3	86	—
3. Quassiaholz	84	Sp–10, 0–Sp	94	Sp— 9, 0—2	86	—
4. Rotholz	85	Sp–10, 0–Sp	94	Sp— 8, 0—2	50	—
5. Gelbholz	70	Sp– 8, 0–Sp	83	Sp— 7, 0—2	85	—
6. Curcuma	60	Sp– 6, 0	83	Sp— 4, 0—1	65	—
7. Alkanna	85	Sp–10, 0–Sp	93	Sp— 9, 0—2	86	—
8. Krapp	83	Sp– 9, 0–Sp	87	Sp— 8, 0—2	85	—
9. Blauholz	85	Sp–10, 0–Sp	88	Sp— 9, 0—2	89	—
10. Gelbbeeren	86	Sp–10, 0–Sp	90	Sp—10, 0—2	87	—
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	90	W8—17, SSp—3	96	W10—19, S4—9	91	—
2. Roßkastanienholz	90	7—16, Sp—3	96	8—18, 3—8	92	—
3. Quassiaholz	89	8—17, Sp—3	96	9—18, 3—7	92	—
4. Rotholz	89	8—16, Sp—3	96	9—17, 4—8	77	—
5. Gelbholz	80	7—18, Sp—3	90	6—15, 2—5	90	—
6. Curcuma	84	2—11, 0—2	85	3—10, Sp—4	88	—
7. Alkanna	89	7—15, Sp—3	96	8—15, 3—5	91	—
8. Krapp	84	7—18, Sp—3	88	8—16, 3—5	87	—
9. Blauholz	85	7—18, Sp—3	91	8—17, 3—7	92	—
10. Gelbbeeren	90	8—18, Sp—3	95	9—18, 3—8	89	—
Am 6. Versuchstage:						
1. Wasser	94	S 5—12	97	S 30—45	94	S 11—18
2. Roßkastanienholz	94	5—11	97	28—43	95	10—18
3. Quassiaholz	93	4—12	97	27—35	93	10—18
4. Rotholz	92	4—11	96	26—38	86	0—10
5. Gelbholz	90	4—10	93	19—30	93	5—12
6. Curcuma	93	2—10	89	15—31	92	6—12
7. Alkanna	93	3—11	97	16—32	91	7—17
8. Krapp	89	5—12	95	30—43	91	8—18
9. Blauholz	91	5—11	93	26—41	94	6—16
10. Gelbbeeren	93	5—12	96	30—44	94	8—16
Am 8. Versuchstage:						
1. Wasser	94	S 13—24	97	S 48—82	95	S 18—35
2. Roßkastanienholz	94	13—23	97	45—80	96	17—36
3. Quassiaholz	93	12—24	97	44—70	94	15—35
4. Rotholz	92	11—21	96	44—72	88	v
5. Gelbholz	90	10—21	93	36—69	93	v
6. Curcuma	92	10—21	89	40—70	92	12—34
7. Alkanna	92	11—23	97	40—74	91	13—36
8. Krapp	90	13—24	95	46—80	92	15—35
9. Blauholz	91	12—23	93	38—77	94	11—20
10. Gelbbeeren	93	12—24	96	49—83	94	14—35

VII. Versuchsreihe (Fortsetzung).

Die Quellungsflüssigkeit enthielt 3,3 Proz. Rohfarbstoffe	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Weißer Senf
Am 10. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 25—47	—	S 85—120	—	S 33—50
2. Roßkastanienholz .	—	24—48	—	80—115	—	32—50
3. Quassiaholz . .	—	23—48	—	76—103	—	30—50
4. Rotholz	—	21—46	—	75—104	—	v
5. Gelbholz . . .	—	21—42	—	65—102	—	22—42
6. Curcuma . . .	—	22—45	—	72—108	—	26—48
7. Alkanna	—	24—47	—	73—108	—	27—50
8. Krapp	—	25—48	—	79—117	—	32—50
9. Blauholz . . .	—	24—44	—	71—109	—	24—44
10. Gelbbeeren . .	—	24—48	—	87—122	—	28—47
Am 13. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 68—95	—	S 120—160	—	S 45—62
2. Roßkastanienholz .	—	65—93	—	118—160	—	43—60
3. Quassiaholz . .	—	63—94	—	115 -157	—	40—58
4. Rotholz	—	62—93	—	115—160	—	v
5. Gelbholz . . .	—	58—88	—	105—147	—	34—55
6. Curcuma . . .	—	62—94	—	113—161	—	40—60
7. Alkanna	—	64—95	—	114—160	—	41—62
8. Krapp	—	63—95	—	115—161	—	42—61
9. Blauholz . . .	—	61—90	—	110—150	—	35—56
10. Gelbbeeren . .	—	66—96	—	120—162	—	40—60

Das Wachstum der Wurzeln war bei Roßkastanienholz, Quassia, Gelbbeeren, Alkanna und Krapp nahezu normal, bei Rotholz zeigten nur die Wurzeln der Wicken und des Weizens fast normale Entwicklung, dagegen waren die Rapswurzeln geschädigt. Eine größere Schädigung zeigten in zunehmender Reihenfolge die Wurzeln bei Curcuma, Blauholz und Gelbholz.

VIII. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 14. bis 28. April.
Zimmertemperatur: 9 bis 16° R.

Die Quellungsflüssigkeit enthielt 3,3 Proz. Rohfarbstoffe	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Weißer Senf
Am 2. Versuchstage:						
1. Wasser	78	W Sp—6, S 0	94	W Sp—5, S0—2	85	—
2. Saflor	50	Sp—4, 0	80	Sp—3, 0—1	6	—
3. Sandelholz . .	75	Sp—5, 0	82	Sp—4, 0—2	32	—
4. Wau	53	Sp—3, 0	88	Sp—3, 0—2	13	—
5. Waid	55	Sp—4, 0	82	Sp—3, 0—1	25	—
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	83	W9—14, SSp-2	95	W 5—10, S 2—5	91	—
2. Saflor	80	3— 8, 0—Sp	87	3— 9, 1—4	17	—
3. Sandelholz . .	77	5—10, 0—Sp	86	4—10, 1—5	36	—
4. Wau	82	3— 8, 0—Sp	90	4—10, 1—4	34	—
5. Waid	85	4—10, 0—Sp	88	4—10, 1—5	40	—

VIII. Versuchsreihe (Fortsetzung).

Die Quellungsflüssigkeit enthielt 3,3 Proz. Rohfarbstoffe	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Weißer Senf
Am 5. Versuchstage:						
1. Wasser	92	W18—30, S4—9	97	S 18—33	94	S 6—16
2. Saflor	92	12—23, 4—9	96	9—27	83	0— 6
3. Sandelholz . .	87	12—23, 2—6	94	10—27	87	0— 6
4. Wau	83	11—25, 2—6	96	12—29	87	2—11
5. Waid	88	12—28, 3—6	96	13—30	91	4—14
Am 7. Versuchstage:						
1. Wasser	94	S 10—23	97	S 50—73	94	S 16—30
2. Saflor	94	8—18	96	42—70	85	v
3. Sandelholz . .	92	9—20	94	35—60	87	v
4. Wau	92	9—20	96	40—72	89	10—30
5. Waid	93	9—24	96	40—72	91	14—31
Am 9. Versuchstage:						
1. Wasser	94	S 28—50	97	S 75—120	94	S 22—45
2. Saflor	94	23—45	96	65—114	85	v
3. Sandelholz . .	93	24—48	94	56—110	87	v
4. Wau	93	25—42	96	70—120	89	20—46
5. Waid	94	27—51	96	76—123	91	24—50
Am 12. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 55—82	—	S 120—170	—	S 32—60
2. Saflor	—	48—70	—	110—165	—	v
3. Sandelholz . .	—	53—80	—	90—136	—	v
4. Wau	—	54—79	—	116—170	—	30—62
5. Waid	—	55—85	—	120—172	—	32—63

Die Entwicklung des Wurzelsystems blieb bei Waid und Wau nur wenig hinter dem Kontrollversuch zurück, mehr beeinträcht war sie bei Saflor, insbesondere bei Senf, relativ am schwächsten entwickelt waren die Wurzeln bei Sandelholz.

IX. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 28. April bis 12. Mai.

Zimmertemperatur: 11 bis 16° R.

Die Quellungsflüssigkeit enthielt 3,3 Proz. Rohfarbstoffe	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Weißer Senf
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	84	WSp-15, S0-2	95	W3—12, SSp—4	84	—
2. Gelbholzextrakt	29	Sp- 5, 0	32	Sp— 6, 0—2	0	—
3. Quercitronextr. .	83	Sp- 7, 0-Sp	92	Sp—10, 0—3	59	—
4. Rotholzextrakt .	67	Sp- 6, 0-Sp	57	Sp— 8, 0—3	41	—
5. Blauholzextrakt	79	Sp- 7, 0-Sp	47	Sp— 8, 0—3	42	—
6. Orseille	70	Sp- 9, 0-2	90	Sp—10, 0—3	80	—
7. Alkannaextrakt .	43	Sp- 3, 0	30	Sp, 0	0	—
8. Lackmus	22	Sp- 5, 0-Sp	55	Sp— 8, 0—3	0	—
9. Indigotin	75	Sp-12, 0-2	80	Sp—10, 0—4	75	—
10. Gummigutt. . .	84	Sp-11, 0-2	81	Sp— 9, 0—3	88	—

IX. Versuchsreihe (Fortsetzung).

Die Quellungsflüssigkeit enthielt 3,3 Proz. Rohfarbstoffe	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Weißer Senf
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	89	W11–22, S2—4	96	W12–15, S8—17	94	S 5—9
2. Gelbholzextrakt	37	Sp– 7, 0—2	33	v , 0— 4	0	—
3. Quercitronextr. .	89	6–14, Sp—2	95	7–14, 4—10	76	Sp—6
4. Rotholzextrakt .	73	2– 8, 0—2	59	0– 7, 3— 8	55	v
5. Blauholzextrakt	85	4–10, Sp—3	51	0– 8, 3— 9	57	0—3
6. Orseille	72	5–20, Sp—4	94	8–21, 5—15	88	0—5
7. Alkannaextrakt.	57	2– 8, 0—2	48	Sp– 7, 0— 3	0	—
8. Lackmus	25	Sp– 7, 0—2	67	2–15, 2—13	0	—
9. Indigotin	85	8–21, 2—4	86	9–23, 8—17	84	2—8
10. Gummigutt. . .	90	10–18, Sp—3	88	5–15, 3—12	93	2—5
Am 6. Versuchstage:						
1. Wasser	94	W14–35, S5—10	96	S 27—47	95	S10—20
2. Gelbholzextrakt	57	Sp–10, 0— 5	39	0—17	9	v
3. Quercitronextr. .	95	10–28, 3— 9	96	20—43	90	7—19
4. Rotholzextrakt .	75	3–15, Sp— 5	65	4— 7	57	v
5. Blauholzextrakt	93	5–18, 2— 8	59	6—30	58	6—15
6. Orseille	86	10–32, 4—10	96	25—46	90	5—19
7. Alkannaextrakt.	65	2–18, Sp— 6	74	5—20	0	—
8. Lackmus	33	Sp–12, Sp— 7	71	22—42	0	—
9. Indigotin	85	10–33, 5—10	89	26—46	90	7—20
10. Gummigutt. . .	92	11–30, 4— 9	94	20—40	95	7—17
Am 8. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 10—26	—	S 40—90	—	S15—30
2. Gelbholzextrakt	—	3—15	—	10—50	—	v
3. Quercitronextr. .	—	8—21	—	35—80	—	10—28
4. Rotholzextrakt .	—	4—14	—	20—40	—	v
5. Blauholzextrakt	—	4—20	—	25—64	—	10—20
6. Orseille	—	10—26	—	40—88	—	13—30
7. Alkannaextrakt.	—	5—21	—	15—50	—	—
8. Lackmus	—	4—20	—	38—82	—	—
9. Indigotin	—	9—25	—	40—87	—	13—30
10. Gummigutt. . .	—	10—24	—	34—73	—	10—27
Am 10. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 20—37	—	S 78—130	—	S21—40
2. Gelbholzextrakt	—	5—20	—	20— 70	—	4—16
3. Quercitronextr. .	—	17—34	—	70—120	—	18—39
4. Rotholzextrakt .	—	7—18	—	30— 76	—	v
5. Blauholzextrakt	—	6—30	—	40— 95	—	v
6. Orseille	—	17—36	—	75—127	—	20—40
7. Alkannaextrakt.	—	7—31	—	50—110	—	—
8. Lackmus	—	6—30	—	60—128	—	—
9. Indigotin . . .	—	19—36	—	72—130	—	20—40
10. Gummigutt . .	—	18—36	—	65—116	—	18—38
Am 13. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 40—70	—	S 100—160	—	33—60
2. Gelbholzextrakt	—	20—40	—	36—100	—	10—30
3. Quercitronextr. .	—	35—65	—	97—156	—	30—57
4. Rotholzextrakt .	—	20—44	—	40–105	—	v
5. Blauholzextrakt	—	25—60	—	55—130	—	v
6. Orseille	—	40—66	—	100—160	—	30—58

IX. Versuchsreihe (Fortsetzung).

Die Quellungsflüssigkeit enthielt 3,3 Proz. Rohfarbstoffe	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Weißer Senf
7. Alkannaextrakt .	—	S 30—62	—	S 70—150	—	—
8. Lackmus	—	28—60	—	80—160	—	—
9. Indigotin	—	40—70	—	90—160	—	30—60
10. Gummigutt . . .	—	40—70	—	94—148	—	30—55

Das Wurzelsystem war relativ am besten entwickelt und stand dem Kontrollversuch am nächsten bei Indigotin, Orseille und Quercitronextrakt, dann folgte Gummigutt, weiterhin mit zunehmender Schädigung: Lackmus, Alkanna-, Blauholz-, Rotholz- und Gelbholzextrakt.

X. Versuchsreihe. Jahreszeit und Versuchsdauer: 1. bis 14. Juni. Zimmertemperatur: 15 bis 19° R.

Die Quellungsflüssigkeit enthielt 1 Proz. Rohfarbstoffe	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Weißer Senf
Am 2. Versuchstage:						
1. Wasser	80	—	94	—	83	—
2. Gelbholzextrakt .	15	—	20	—	3	—
3. Quercitronextrakt	48	—	92	—	60	—
4. Rotholzextrakt .	66	—	85	—	33	—
5. Blauholzextrakt .	43	—	73	—	50	—
6. Orseille	79	—	88	—	53	—
7. Lackmus	60	—	84	—	53	—
8. Gummigutt . . .	82	—	93	—	83	—
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	88	W6—12, SSp—2	95	W6—16, S 3—7	87	—
2. Gelbholzextrakt .	85	Sp— 6, 0—Sp	36	Sp— 7, 0—3	11	—
3. Quercitronextrakt	90	5—10, Sp—2	94	3—12, 2—5	83	—
4. Rotholzextrakt .	89	5—10, Sp—2	88	3—10, 1—4	59	—
5. Blauholzextrakt .	89	3— 9, 0—2	77	2— 9, 0—3	57	—
6. Orseille	90	5—11, Sp—2	94	5—11, 3—5	83	—
7. Lackmus	87	4—10, Sp—2	90	4—11, 3—5	92	—
8. Gummigutt . . .	91	6—10, Sp—2	95	4—12, 2—5	88	—
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	94	W16—26, S4—7	96	W15—25, S9—20	94	—
2. Gelbholzextrakt .	91	2—15, 0—3	57	5—15, Sp—10	16	—
3. Quercitronextrakt	94	11—24, 3—7	96	13—24, 8—18	91	—
4. Rotholzextrakt .	93	10—21, 3—6	91	12—23, 5—15	79	—
5. Blauholzextrakt .	90	8—18, 3—5	90	6—16, 3— 9	75	—
6. Orseille	94	12—23, 3—7	95	14—24, 8—19	90	—
7. Lackmus	93	10—21, 3—6	93	12—24, 7—19	90	—
8. Gummigutt . . .	95	14—23, 3—7	96	14—25, 8—19	94	—
Am 6. Versuchstage:						
1. Wasser	95	S 16—25	96	S 36—70	94	S 18—30
2. Gelbholzextrakt .	91	9—20	57	24—40	16	v
3. Quercitronextrakt	94	14—24	96	35—68	91	16—30
4. Rotholzextrakt .	93	10—23	93	28—63	80	10—23
5. Blauholzextrakt .	91	10—22	91	25—58	76	10—22
6. Orseille	94	14—25	95	34—70	90	10—25
7. Lackmus	90	13—25	94	32—70	90	10—26
8. Gummigutt . . .	95	14—25	96	35—70	94	17—30

X. Versuchsreihe (Fortsetzung).

Die Quellungsflüssigkeit enthielt 1 Proz. Rohfarbstoffe	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Weißer Senf
Am 8. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 40—60	—	S 70—110	—	S 30—50
2. Gelbholzextrakt .	—	30—53	—	50— 72	—	v
3. Quercitronextrakt	—	38—65	—	70—108	—	25—51
4. Rotholzextrakt .	—	32—56	—	50— 90	—	30—50
5. Blauholzextrakt .	—	35—57	—	50— 90	—	20—46
6. Orseille	—	38—58	—	70—112	—	21—47
7. Lackmus	—	39—60	—	66—110	—	22—48
8. Gummigutt . . .	—	37—58	—	68—110	—	30—50
Am 10. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 70—120	—	S 110—165	—	S 40—60
2. Gelbholzextrakt .	—	60—115	—	80—120	—	v
3. Quercitronextrakt	—	72—130	—	80—150	—	38—60
4. Rotholzextrakt .	—	60—106	—	80—140	—	33—55
5. Blauholzextrakt .	—	64—112	—	80—140	—	32—57
6. Orseille	—	69—118	—	100—163	—	34—58
7. Lackmus	—	70—120	—	108—162	—	35—58
8. Gummigutt . . .	—	68—114	—	98—157	—	40—60
Am 12. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 120—170	—	S 140—185	—	S 43—64
2. Gelbholzextrakt .	—	105—165	—	116—165	—	v
3. Quercitronextrakt	—	120—170	—	130—180	—	40—64
4. Rotholzextrakt .	—	118—160	—	110—160	—	35—58
5. Blauholzextrakt .	—	120—160	—	110—165	—	36—60
6. Orseille	—	120—170	—	136—184	—	39—60
7. Lackmus	—	120—170	—	135—185	—	40—60
8. Gummigutt . . .	—	120—165	—	130—180	—	43—63

Das Wachstum der Wurzeln war mehr oder weniger geschwächt, und zwar mit zunehmender Schädigung bei Quercitron, Orseille, Lackmus, Blauholzextrakt, Rotholzextrakt, Gummigutt; am meisten geschädigt waren die Wurzeln bei Gelbholzextrakt.

XI. Versuchsreihe.

Jahreszeit und Versuchsdauer: 15. bis 30. Juni.

Zimmertemperatur: 15 bis 19° R.

Die Quellungsflüssigkeit enthielt 0,33 Proz. Rohfarbstoffe	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Weißer Senf
Am 3. Versuchstage:						
1. Wasser	91	W5—12, SSp—2	95	W5—14, S3—6	90	—
2. Gelbholzextrakt .	86	2—10, 0—2	85	3—11, 2—5	59	—
3. Quercitronextrakt	86	3—10, 0—2	90	3—11, 2—5	80	—
4. Rotholzextrakt .	88	4—11, 0—2	90	4—11, 3—5	80	—
5. Blauholzextrakt .	88	4—10, 0—2	91	4—11, 3—5	87	—
6. Orseille	87	4—11, Sp—2	91	4—12, 3—5	85	—
7. Lackmus	76	4—10, 0—2	91	4—12, 3—5	86	—
8. Gummigutt . . .	90	4—11, 0—2	92	4—12, 3—5	89	—

XI. Versuchsreihe (Fortsetzung).

Die Quellungsflüssigkeit enthielt 0,33 Proz. Rohfarbstoffe	Keimprozente	Wicken	Keimprozente	Weizen	Keimprozente	Weißer Senf
Am 4. Versuchstage:						
1. Wasser	94	W12—25, S3—6	96	W13—27, S9—20	95	—
2. Gelbholzextrakt	93	5—20, 2—5	89	5—20, 6—12	81	—
3. Quercitronextrakt	90	6—19, 2—5	92	8—24, 7—19	87	—
4. Rotholzextrakt	90	6—19, 2—5	92	8—23, 7—18	89	—
5. Blauholzextrakt	93	7—18, 2—5	93	8—22, 7—16	91	—
6. Orseille	90	8—17, 2—5	93	8—23, 8—17	91	—
7. Lackmus	87	7—16, 2—5	93	8—24, 8—18	93	—
8. Gummigutt	91	7—19, 2—5	94	9—24, 7—18	95	—
Am 8. Versuchstage:						
1. Wasser	95	S 26—40	96	S 50—100	95	S 20—38
2. Gelbholzextrakt	95	20—35	94	46—90	83	12—20
3. Quercitronextrakt	93	18—38	95	50—98	91	12—30
4. Rotholzextrakt	95	18—38	94	44—93	91	12—30
5. Blauholzextrakt	95	20—40	93	50—98	93	14—36
6. Orseille	94	23—40	94	50—98	93	14—37
7. Lackmus	94	19—38	94	43—97	95	15—39
8. Gummigutt	94	25—40	95	50—95	95	13—37
Am 10. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 53—83	—	S 90—147	—	S 28—50
2. Gelbholzextrakt	—	44—78	—	65—136	—	18—40
3. Quercitronextrakt	—	40—80	—	80—145	—	19—48
4. Rotholzextrakt	—	44—76	—	85—135	—	20—45
5. Blauholzextrakt	—	36—82	—	86—139	—	20—48
6. Orseille	—	40—85	—	86—142	—	21—48
7. Lackmus	—	38—84	—	82—140	—	21—48
8. Gummigutt	—	50—80	—	90—136	—	21—47
Am 12. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 70—108	—	S 100—150	—	S 28—54
2. Gelbholzextrakt	—	60—100	—	90—140	—	21—45
3. Quercitronextrakt	—	58—107	—	95—152	—	23—50
4. Rotholzextrakt	—	62—106	—	94—140	—	22—48
5. Blauholzextrakt	—	56—102	—	95—144	—	22—49
6. Orseille	—	64—105	—	97—150	—	23—52
7. Lackmus	—	62—103	—	95—148	—	23—51
8. Gummigutt	—	65—108	—	100—150	—	23—50
Am 15. Versuchstage:						
1. Wasser	—	S 126—173	—	S 140—194	—	S 43—64
2. Gelbholzextrakt	—	115—170	—	134—190	—	33—56
3. Quercitronextrakt	—	115—172	—	140—192	—	40—64
4. Rotholzextrakt	—	116—170	—	135—190	—	37—60
5. Blauholzextrakt	—	114—170	—	135—190	—	38—61
6. Orseille	—	120—172	—	136—193	—	39—63
7. Lackmus	—	119—171	—	135—193	—	40—62
8. Gummigutt	—	118—172	—	140—191	—	40—63

Während das Stengelwachstum fast durchweg normal verlief, war das Wurzelsystem etwas schwächer entwickelt als beim Kontrollversuch, und zwar mit zunehmender Schwächung bei Blauholzextrakt, Quercitronextrakt, Orseille, Lackmus, Rotholzextrakt, Gummigutt und Gelbholzextrakt.

Über den Einfluß des Insulins und einiger anderer Stoffe auf den Milchsäurestoffwechsel.

Versuche über die Blutmilchsäure und den Blutzucker bei Kaninchen.

Von

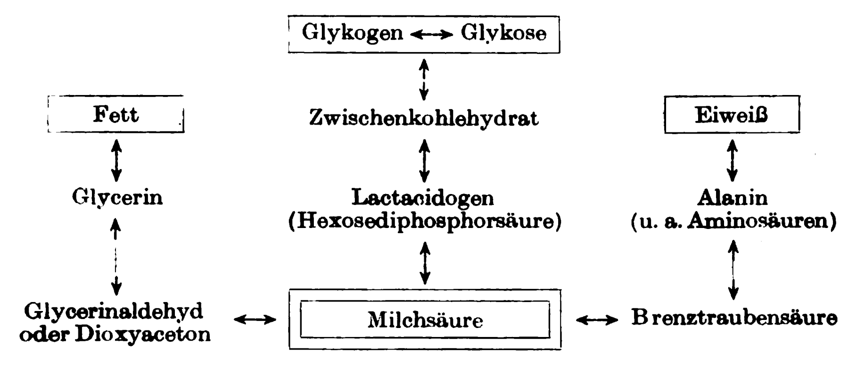
J. A. Collazo und J. Supniewski.

(Aus der biochemischen Abteilung des staatlichen hygienischen Instituts und dem Institut für Serumforschung in Warschau.)

(Eingegangen am 27. November 1924.)

Einleitung.

In der Milchsäure haben wir einen Stoff vor uns, dessen wichtige Rolle in dem intermediären *Kohlehydratstoffwechsel* bekannt ist, der aber auch in mannigfaltigen Beziehungen zu dem Stoffwechsel der *Aminosäuren* und der *Fette* steht. Die Milchsäurebildung kann sowohl aus den Kohlehydraten wie aus den Zerfallsprodukten des Eiweißes und der Fette erfolgen und umgekehrt. Darüber siehe das nachfolgende Schema[1]), aus welchem die vielfältige Stellung der Milchsäure im allgemeinen Stoffwechsel ersichtlich wird:



Es muß darauf verwiesen werden, daß die Milchsäure auch in beträchtlichen Mengen in der *intestinal-bakteriellen Gärung* erzeugt wird, wo sie eine wichtige Aufgabe gegenüber der Proteinfäulnis zu erfüllen

[1]) Aus der Arbeit: „Der Milchsäurestoffwechsel bei Diabetikern und seine Beeinflussung durch Insulin". *Collazo* und *Lewicki*, Deutsche med. Wochenschr. 1924 (im Druck).

hat. Ob sich nun diese Milchsäure aus dem Darmtraktus in der Leber polymerisiert oder umwandelt oder aber in den allgemeinen Blutkreislauf eintritt, bleibe dahingestellt. Auf jeden Fall aber scheint der Darm eine nicht zu verachtende Milchsäurequelle darzustellen.

Die Umwandlung von *Kohlehydraten* in Milchsäure im tierischen Organismus haben *Embden* und *Almagia*[1]) exakt nachgewiesen. Sie wiesen bei der Durchblutung einer glykogenhaltigen Leber eine Vermehrung der Blutmilchsäure, bei der Durchblutung der glykogenfreien ein Gleichbleiben der Milchsäure nach, während sich bei Zusatz von Zucker oder d-l-Alanin bei der Durchblutung der glykogenfreien Leber eine Vermehrung der Milchsäure feststellen ließ.

Die Entstehung der Milchsäure aus *Aminosäuren* (Alanin) war zuerst von *Neuberg* und *Langstein*[2]) sowie *Embden* und *Salomon*[3]) mit Fütterungsversuchen und von *von Noorden* und *Embden*[4]) in Durchblutungsversuchen festgestellt.

Weitere Angaben über diese Fragen finden sich bei *Embden* und seinen Mitarbeitern in dieser Zeitschr. **45**, 1 bis 206, 1912, und in Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **98**, 1 bis 124, 1914/15. Aus den Versuchen von *Lüthje*[5]) und der Schule von *Embden* geht hervor, daß das *Glycerin* ebenfalls ein Zucker- und Milchsäurebildner ist.

Die bisherigen Untersuchungen auf dem Gebiete des Kohlehydratstoffwechsels beschäftigten sich vor allen Dingen mit den Verhältnissen des *Traubenzuckers* und des *Glykogens*. Wenn wir vom *Acetaldehyd* absehen, der nach den Ergebnissen von *Neuberg*[6]) und seinen Mitarbeitern [*Hirsch*[7]) sowie *Gottschalk*[8])] auch bei Warmblütern eine bedeutende Rolle im Kohlehydratstoffwechsel besitzt, dessen *Bestimmung jedoch im Blute* sowie der anderen Spaltungsprodukte wie der Ameisensäure, Äthylalkohol, Glycerin, Essigsäure[9]) usw. praktisch infolge der winzig kleinen Mengen mit verschiedenen Schwierigkeiten verbunden ist, so kann man wohl *die Milchsäure als die dritte Substanz betrachten, die verhältnismäßig leicht faßbar und bestimmbar ist und deren Verfolgung bei klinischen sowie experimentellen Untersuchungen neue Ausblicke für die Lehre vom Gesamtstoffwechsel verspricht angesichts der eben erwähnten dreifachen Möglichkeit der Milchsäureabstammung.*

---

[1]) *Embden* und *Almagia*, Zentralbl. f. Physiol. **18**, 832, 1905.

[2]) *Neuberg* und *Langstein*, Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt., 1903, S. 514.

[3]) *Embden* und *Salomon*, Beitr. z. chem. Pathol. u. Physiol. **5**, 507, 1904.

[4]) *Von Noorden* und *Embden*, Zentralbl. f. d. ges. Physiol. u. Anat. des Stoffwechsels, Neue Folge, 1906, H. 1, S. 1.

[5]) *Lüthje*, Arch. f. klin. Med. **80**, 101, 1905.

[6]) *Neuberg*, Ber. **55**, 3624, 1922.

[7]) *Hirsch*, diese Zeitschr. **117**, 113, 1921; **134**, 415, 1922.

[8]) *Neuberg* und *Gottschalk*, Klin. Wochenschr. **31**, 1458, 1923; diese Zeitschr. **146**, 164, 1924; **146**, 185, 1924.

[9]) *Stepp* und Mitarbeiter, Zeitschr. der physiol. Chem. **107**, 29, 1919; **114**, 301, 1921; diese Zeitschr. **107**, 60, 1920; **130**, 578, 1922; **146**, 349, 1924.

Durch die so erfolgreichen Forschungen von *Fletcher* und *Hopkins*[1]), *Embden* und seiner Schule, von *Meyerhof*[2]), *Hill*[3]) und *Parnas*[4]) u. a. sind wir über die Bedeutung der Milchsäure für die *Muskelphysiologie* ziemlich genau unterrichtet. Wir wissen, daß während der Muskelkontraktion proportional mit der geleisteten Arbeit Milchsäure gebildet wird, die dann in der zweiten oxydativen Phase schwindet. Wir wissen ferner, daß auch postmortal sich im Muskelbrei Milchsäure anhäuft und betrachten dies als Ausdruck der weiter laufenden Lebensvorgänge. Beim Schwinden der Milchsäure schwindet auch die entsprechende Menge Glykogen, während Glucose und Lactacidogen sich verschiedentlich ändern. Ähnliches geht auch *im ruhenden* lebenden Muskel vor sich [*Meyerhof*[5])]. In mehreren von *Embden* und seiner Schule und anderen durchgeführten Arbeiten wurde gezeigt, daß sowohl bei der künstlichen Durchblutung *der Leber* als auch bei der sogenannten Glykolyse *im Blute* Milchsäure aus Traubenzucker gebildet wird. In unserer Arbeit handelt es sich nicht darum, den Chemismus der Umwandlung von Traubenzucker und anderen Stoffen in Milchsäure näher aufzuklären, nachdem darüber noch die verschiedensten Forscher nicht einhelliger Ansicht sind.

Um das *Verhalten der Milchsäure in der Physiologie* des Kaninchens zu studieren, haben wir zahlreiche *Blutuntersuchungen* vorgenommen. Es war uns klar, daß die Untersuchung gerade des Blutes, die ja am lebenden Tiere und Menschen durchgeführt wird, so manche Aufklärung und Hinweise über die Lebensvorgänge bieten muß. Die Milchsäurebestimmungen haben wir mittels eigener Methode durchgeführt, die bequemes und genaues Arbeiten gestattet.

Wir versprachen uns beim Ausarbeiten dieser Methode, daß die Milchsäureuntersuchung auch für die Klinik praktisch in Betracht zu ziehen wäre. *Die Stellung der Milchsäure in der Pathologie ist noch wenig bekannt*, sowie ihre Beeinflussung durch die verschiedenen Hormone und Stoffe, welche den Stoffwechsel regulieren.

So wird sie z. B. in der letzten Zeit mit dem *Geschwulstwachstum* in Beziehung gebracht als auch versucht, von ihr die Diagnose einiger Krebsarten abzuleiten. Dies ist in Übereinstimmung mit den vor langer Zeit durchgeführten Versuchen von *von Noorden*[6]) und *Boas*, nach welchen durch die Krebszelle selbst Milchsäure erzeugt wird und daß die Milchsäurebildung etwas für den Krebs Pathognomonisches ist. [*Glaessner*[7]),

---

[1]) *Fletcher* und *Hopkins*, Journ. of Physiol. **35**, 247, 1907.

[2]) *Meyerhof*, Ergebn. d. Physiol. **22**, 300, 1924; Nobelvorlesung, 1923, Stockholm.

[3]) *Hill*, Ergebn. d. Physiol. **22**, 300, 1924.

[4]) *Parnas* und *Baer*, diese Zeitschr. **47**, 386, 1912.

[5]) *Meyerhof*, Pflügers Arch. **182**, 232, 1920; **185**, 20, 1920.

[6]) *von Noorden*, Pathologie des Stoffwechsels **2**, Berlin-Wien 1906 und *F. Blumenthal*, Handb. d. spez. Path. d. Harns, Berlin-Wien 1913.

[7]) *Glässner*, Wien. klin. Wochenschr. **15**, 358, 1924.

Wattermann[1]), *Warburg* und *Minami*[2]), *Braunstein*[3]), *Wiechmann*[4]), *Warburg*[5]), *Händel* und *Tadenuma*[6]), *Minami*[7]), *Neuschlosz*[8]), *Warburg, Negelein* und *Posener*[9]).]

Die Fähigkeit der Milchsäurebildung aus Glucose und des reversiblen Prozesses der Glucosebildung aus Milchsäure fehlt in der Leber des pankreaslosen Tieres und bei Phlorhizindiabetes, was für *das Vorhandensein einer Störung des Milchsäurestoffwechsels in der Pathologie des Diabetes spricht* [*Isaac* und Mitarbeiter[10])].

Bei akuter gelber Leberatrophie[11]) wird Milchsäure ausgeschieden, was wieder für Beziehungen zur Leber zu verwerten ist. Alle diese Umstände müßten neuerdings mit Hilfe der Blutuntersuchung studiert werden, um das Wesentliche der Störungen zu erkennen.

Bei Kohlenoxydvergiftungen und überhaupt im allgemeinen *bei Mangel von Sauerstoff* wurde im Harne und Blute eine Steigerung der Milchsäure beobachtet [*Hoppe-Seyler, Araki* u. a.[12])]. *Laquer*[13]) hat bei Hunden nachgewiesen, daß die *Muskelarbeit* eine Steigerung der Milchsäure bis weit über 300 Proz. herbeiführt, während nach einer Ruhezeit von nur einigen Minuten der Normalwert wieder erreicht wurde (Bergsteigen mit einem Hund bis 2500 m Höhe), was mit früheren Versuchen von *Irisawa*[14]) übereinstimmt. Es wurde auch vermutet, daß die *eklamptischen Krämpfe* durch die Milchsäure hervorgerufen werden, was als nicht wahrscheinlich bezeichnet werden muß [*Ten Dornshate*[15])].

Über den Normalwert der Blutmilchsäure bei Kaninchen.

Bevor wir in Betrachtungen über das Verhalten der Blutmilchsäure bei Kaninchen nach Injektion von Insulin und anderen Stoffen eingehen, wollen wir über den Gehalt des normalen Kaninchenblutes an Milchsäure bei 18 bis 24 Stunden nüchternen Tieren sprechen: In

---

[1]) *Wattermann*, diese Zeitschr. **135**, 1923; Klin. Wochenschr. **27**, 1225, 1924.

[2]) *Warburg* und *Minami*, Klin. Wochenschr. **17**, 776, 1923.

[3]) *Braunstein*, ebendaselbst **18**, 788, 1924.

[4]) *Wiechmann*, ebendaselbst **12**, 481, 1924.

[5]) *Warburg*, diese Zeitschr. **142**, 317, 1923.

[6]) *Händel* und *Tadenuma*, Münch. med. Wochenschr. **26**, 1924; Zeitschr. f. Krebsforschung **21**, 197, 1924.

[7]) *Minami*, diese Zeitschr. **142**, 333, 1923.

[8]) *Neuschlosz*, Klin. Wochenschr. **2**, 57, 1924.

[9]) *Warburg, Negelein* und *Posener*, ebendaselbst **24**, 1062, 1924; diese Zeitschr. **152**, 309, 1924.

[10]) *Isaac* und *Frank*, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **64**, 293, 1911.

[11]) *v. Noorden*, Pathologie des Stoffwechsels, 2. Band, Wien-Berlin **1906**.

[12]) *Hoppe-Seyler* und *Araki*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **19**, 422; **20**, 365. 1895; *Macleod*, Amer. Journ. of Physiol. **55**, 148, 1921; *Saito* und *Katsuyama*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 1902.

[13]) *Laquer*, Pflügers Arch. **203**. 35, 1924.

[14]) *Irisawa*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **17**, 340.

[15]) *Ten Dornshate*, ebendaselbst **54**.

der Literatur konnten wir bisher keine Angaben über diese Frage finden. In einer Anzahl von 64 Kaninchen, deren Blut wir vor irgend einer Einspritzung diesbezüglich untersuchten, fanden wir Schwankungen für den Milchsäurewert von 0,013 bis 0,135. Was die sehr seltenen Werte von über 100 anlangt, so nehmen wir an, daß diese Tiere entweder vor den Versuchen doch etwas zu sich genommen hatten oder aber daß diese hohen Werte auf die große sympathische Erregbarkeit der Kaninchen zurückzuführen sind, denn wir werden noch später nachweisen, daß das Adrenalin eine beschleunigtere Milchsäurebildung hervorruft. Der Mittelwert aus allen 64 Fällen ergibt einen Betrag von 0,051, während sich, im Falle wir die vier Werte über 100 aus den angeführten Gründen ausschalten, eine Ziffer von *0,045* ergibt, welche als der *normale Mittelwert der Blutmilchsäure bei Kaninchen* bezeichnet werden muß. Wir bemerken dazu, daß bis heute physiologische Versuche über den Blutmilchsäuregehalt bei den *verschiedenen Tiergattungen* nicht bekannt sind. Einer von uns (*Collazo*) hat sich in dieser Hinsicht bemüht, jedoch sind die bisherigen Versuche zu spärlich, um eine allgemein gültige Folgerung daraus ableiten zu können. Als feststehend kann jedoch angenommen werden, daß verschiedene Faktoren auf den Milchsäuregehalt bestimmend einwirken: Nämlich 1. *die Art und Zusammensetzung der Nahrung.* Z. B. ist bei Kaninchen, die sich mit einem an Kohlehydraten überaus reichen Futter ernähren, wie wir eben gesehen haben, festgestellt worden, daß ihr Blutmilchsäuregehalt um 200 Proz. höher als beim Menschen ist, wo bei stoffwechselgesunden Menschen und gemischter Kost *Collazo* und *Lewicki* bei der Untersuchung von 12 Fällen einen Mittelwert von 0,014 Proz. gefunden haben. Bemerkenswert ist jedoch, daß in beiden Spezien, sowohl bei Kaninchen und Menschen, die Höhe des Blutzuckers gleich ist, nämlich etwa 0,100. 2. Hängt der Blutmilchsäurewert auch von der *individuellen Spezies* selbst ab, z. B. ist bei Pferden, die sich auch von einer kohlehydratreichen Kost ernähren, bei einer Untersuchungsreihe von fünf Fällen ein Mittelwert von 0,008 erhoben worden. 3. Vermutlich hängt die Höhe der Blutmilchsäure überhaupt von der *Lebhaftigkeit des Stoffwechsels* ab, welche ja bei kleinen Tieren bedeutend gesteigerter als bei großen Säugetieren ist. In diesem Sinne kann man die Blutmilchsäure als Maßstab für die Abbauvorgänge der Kohlehydratstoffe ansehen. Diese Vermutungen würden es in der Tat verdienen, durch Versuche entsprechend aufgeklärt zu werden. Zur Unterstreichung dieser Ausführungen weisen wir darauf hin, daß ja auch die Milchsäure unwahrscheinlich als Endprodukt des Kohlehydratstoffwechsels, sondern vielmehr als Zwischenstufe angesehen werden muß, so daß wir nur mit Vorbehalten von einem *Milchsäurespiegel* sprechen können.

Verwendete Insulinpräparate.

Das von uns gebrauchte Insulin wurde uns von der biochemischen Abteilung des staatlichen hygienischen Instituts (Prof. Dr. *Casimir Funk*) zur Verfügung gestellt, wo das Insulin für den allgemeinen Gebrauch fabriksmäßig hergestellt wird. Dieses Insulin wurde nach drei verschiedenen Methoden hergestellt, um durch Versuche das beste von den nach allen drei Arten unter anderen hergestellten Präparaten festzustellen: 1. Alkoholextraktion nach dem klassischen *Collipschen Verfahren*. Gereinigt nach *Dudley* durch pikratorganische Verbindung und in *Hydrochlorid übergeführt*.

2. *Direkte Pikrinsäure-Acetonmethode*, wodurch das Insulinhydrochlorid ohne vorherige Extraktion dargestellt wird.

3. Ausfällung des Insulins mit dem *Mastixsol*.

Es ist wichtig, auf die Verschiedenheit der Methoden aufmerksam zu machen, nachdem die verschiedenen Methoden unterschiedliche Grade der Reinheit des fertigen Insulinpräparats ergeben, und es wird sich zeigen, daß die Blutmilchsäurefrage sehr von der Methode, nach welcher das verwendete Insulin bereitet wurde, abhängt.

Um einen *Vergleichswert* unserer Ergebnisse mit denen der amerikanischen und sonstigen Autoren zu ermöglichen, weisen wir darauf hin, *daß die Mehrzahl der Insulinfabriken dasselbe nach der Pikratreinigungsmethode herstellt*, mit welchen Präparaten, mit Ausnahme *zweier*, auch alle unsere Versuche durchgeführt worden sind. Diese beiden Ausnahmefälle wurden mit nach dem Mastixsolverfahren hergestellten Insulin ausgeführt.

Methodik.

Die Methodik, die schon in einer früheren Arbeit[1]) von uns genauer beschrieben wurde, wobei auch die Literatur Berücksichtigung fand, besteht in folgendem: 1. Die *Entfernung des Eiweißes* nach *Folin* und *Wu*; 2. *Zuckerbestimmung* nach *Mc Lean*; 3. die *Entfernung der Glucose* und anderer reduzierender Stoffe unter Anwendung des *Kupfersulfatverfahrens* nach *Salkowski*, modifiziert von *Hirsch-Kaufmann*; 4. die *Milchsäurebestimmung* nach *Fürth* und *Charnas*. Das aus der Vene mit einigen Kristallen von Natrium- oder Kaliumoxalat aufgefangene Blut wird mit n/12 Schwefelsäure und 10proz. Natriumwolframat versetzt. In einem Teile des Filtrats (nicht waschen!) wird der Zucker bestimmt, in anderen werden mittels 10proz. Kupfersulfats und Kalkmilch die reduzierenden Körper entfernt. Es folgt die Permanganatoxydation und Titration des mit einer n/100 Kaliummetabisulfit abgefangenen Destillats mit einer n/100 Jodlösung.

---

[1]) *Collazo* u. *Supniewski*, Warsz. Czasop. Lek. (polnisch), Nr. 10. 1924.

Experimenteller Teil.

Versuche.

1. *Insulinversuche* (Insulin, nach dem Pikratverfahren hergestellt.) Kaninchen wurden nüchtern (24 Stunden), und zwar mit 1 Einheit Insulin pro 2 kg Gewicht gespritzt und nach $1^1/_2$ Stunden bzw. manchmal nach 2 bis 3 Stunden oder mehr der Blutzucker und die Milchsäure bestimmt. Die Injektion erfolgte subkutan und die Blutentnahme aus der Ohrvene (6 ccm Blut).

	Vorher Proz.	$1^1/_2$ Stunden Proz.	3 Stunden Proz.
Kaninchen Nr. 1, 2050 g Gewicht.			
Blutzucker	0,127	0,053	0,033
Blutmilchsäure	0,049	0,029	0,056
Kaninchen Nr. 2, 2200 g Gewicht.			
Blutzucker	0,128	0,067	—
Blutmilchsäure	0,034	0,036	—
Kaninchen Nr. 5, 2200 g Gewicht.			
Blutzucker	0,051	0,046	0,065
Blutmilchsäure	0,047	0,027	0,032
Kaninchen Nr. 7, 1720 g Gewicht.			
Blutzucker	0,122	0,078	0,094
Blutmilchsäure	0,033	—	0,020
Kaninchen Nr. 8, 1450 g Gewicht.			
Blutzucker	0,102	0,049	0,065
Blutmilchsäure	0,079	—	0,023
Kaninchen Nr. 9, 2000 g Gewicht.			
Blutzucker	0,116	0,108	0,100
Blutmilchsäure	0,055	0,021	0,010
Kaninchen Nr. 12, 1720 g Gewicht.			
Blutzucker	0,140	0,070	0,057
Blutmilchsäure	0,038	0,044	0,014
Kaninchen Nr. 13, 1570 g Gewicht.			
Blutzucker	0,153	0,078	0,083
Blutmilchsäure	0,045	0,021	0,051
Kaninchen Nr. 14, 1900 g Gewicht.			
Blutzucker	0,126	0,067	0,075
Blutmilchsäure	0,055	0,026	0,061
Kaninchen Nr. 18, 1650 g Gewicht.			
Blutzucker	0,126	0,062	0,099
Blutmilchsäure	0,057	0,024	0,055
Kaninchen Nr. 22, 1750 g Gewicht.			
Blutzucker	0,121	0,055	0,070
Blutmilchsäure	0,032	0,026	0,020
Kaninchen Nr. 23, 2030 g Gewicht.			
Blutzucker	0,151	0,067	—
Blutmilchsäure	0,063	0,065	—

	Vorher Proz.	$1^1/_2$ Stunden Proz.	3 Stunden Proz.
Kaninchen Nr. 24, 1820 g Gewicht.			
Blutzucker	0,115	0,042	—
Blutmilchsäure	0,045	0,036	—
Kaninchen Nr. 30, 1690 g Gewicht.			
Blutzucker	0,145	0,047	—
Blutmilchsäure	0,071	0,066	—
Kaninchen Nr. 31, 1990 g Gewicht.			
Blutzucker	0,129	0,053	0,033
Blutmilchsäure	0,059	0,029	0,056
Kaninchen Nr. 32, 2100 g Gewicht.			
Blutzucker	0,128	0,067	0,070
Blutmilchsäure	0,033	0,056	0,061
Kaninchen Nr. 33, 2000 g Gewicht.			
Blutzucker	0,151	0,049	0,065
Blutmilchsäure	0,046	0,027	0,092
Mastixinsulin. Kaninchen Nr. 34, 2200 g Gewicht.			
Blutzucker	0,115	0,020	0,036
Blutmilchsäure	0,080	0,111	0,131
Phosphorsäure (Brigs)	0,0053	0,0032	0,0041
Kaninchen Nr. 35, 2070 g Gewicht.			
Blutzucker	0,115	0,029	0,035
Blutmilchsäure	0,059	0,115	0,122
Phosphorsäure	0,006	0,002	0,0021

Wenn wir die Untersuchungen mit Mastixinsulin wegen der kleinen Versuchszahl außer Betracht lassen, ergibt sich in 15 Fällen folgendes Ergebnis: In 11 Fällen war $1^1/_2$ Stunden nach der Einspritzung ein sehr deutliches Sinken der Milchsäure festzustellen, in den 4 anderen Fällen eine kleine Steigerung oder überhaupt keine Änderung. Nach 3 Stunden war in 8 Fällen eine Senkung und in 5 Fällen eine Steigerung festzustellen. Auf Grund dieser Versuche ergeben sich folgende Mittelwerte für den Milchsäuregehalt im Blut: Vor der Einspritzung 0,049 Proz; $1^1/_2$ Stunden nach der Injektion 0,0358 Proz.; 3 Stunden nach der Injektion 0,041 Proz.

Zusammengefaßt ergibt sich, daß die Wirkung des Insulins auf die Milchsäure in zwei deutlich unterscheidbare Abschnitte zerfällt: 1. Eine Senkung der Milchsäure gleichzeitig mit dem Zucker unmittelbar nach der Einspritzung. 2. Eine fast als Reaktion darauf zu bezeichnende kleine Steigerung, welche in manchen Fällen bis über den Normalwert hinausgeht.

Zwei Phosphorsäuremessungen im Blut bestätigten uns die schon von mehreren Autoren behauptete Senkung derselben nach Insulin.

Die gleichzeitige Senkung des organisch verbundenen Phosphors und der Milchsäure in der ersten Phase der Insulinwirkung spricht nach unserer Vermutung für eine Synthese der Hexosediphosphorsäure (Lactacidogen).

2. *Glucose.* Die Glucose wird intravenös, und zwar 1,5 bis 2 g in 10 ccm Wasser aufgelöst als auch bei anderen Kaninchen per os (5 bis 10 g in 5 bis 10 ccm Wasser aufgelöst) gegeben.

	Blutzucker Proz.	Blutmilchsäure Proz.
Kaninchen Nr. 61, 2000 g Gewicht.		
Vorher	0,127	0,019
10 Minuten nach Injektion von 1½ g Glucose in 10 ccm Wasser	0,504	0,031
Nach ½ Stunde	0,440	0,021
„ 1½ Stunden	0,140	0,026
Kaninchen Nr. 62, 2000 g Gewicht.		
Vorher	0,120	0,022
20 Minuten nach Injektion von 2 g Glucose in 10 ccm Wasser aufgelöst, intravenös	0,610	0,040
Nach ½ Stunde	0,210	0,039
„ 1½ Stunden	0,150	0,034
„ 3 „	0,110	—
Kaninchen Nr. 63, 1920 g Gewicht.		
Vorher	0,110	0,021
1½ Stunden nach 10 g Glucose per os	0,118	0,034
Nach 3 Stunden	0,089	0,050
Kaninchen Nr. 64, 1750 g Gewicht.		
Vorher	0,120	—
1½ Stunden nach 5 g Glucose per os	0,090	0,028
Nach 3 Stunden	0,103	0,038

3. *Glucose + Insulin.*

	Blutzucker Proz.	Blutmilchsäure Proz.
Kaninchen Nr. 68, 1820 g Gewicht. 7 g Glucose in 12 ccm Wasser per os + Insulin.		
Vorher	0,100	0,013
Nach 1½ Stunden	0,067	0,023
„ 3 „	0,085	0,041
Kaninchen Nr. 69, 1920 g Gewicht. 10 g Glucose in 15 ccm Wasser per os + Insulin.		
Vorher	0,110	0,021
Nach 1½ Stunden	0,118	0,039
„ 3 „	0,089	0,050
Kaninchen Nr. 70, 1730 g Gewicht. 5 g Glucose in 10 ccm Wasser per os + Insulin.		
Vorher	0,120	0,019
Nach 1½ Stunden	0,090	0,028
„ 3 „	0,103	0,034

Der Versuch mit intravenöser Glucoseeinspritzung ergibt in der ersten halben Stunde eine ungeheure Steigerung des Blutzuckers mit einer gleichzeitigen Erhöhung der Milchsäure.

Die per-os-Einverleibung des Zuckers zeigt nach 1½ Stunden, wenn also die Zuckerüberschwemmung schon vorüber ist, eine Neigung zur Herabsetzung des Blutzuckers unter den Normalwert, während gerade in diesem Augenblick die Blutmilchsäure deutlich ansteigt.

Glucose + Insulin erhöht diese Wirkung in sehr beträchtlicher Weise. Wir müssen ganz besonders bemerken, daß *die Wirkung des Insulins entgegengesetzt ist, wie man aus einem Vergleich mit der ersten Versuchsreihe entnehmen kann, wenn man die Injektion an einem nüchternen Tier vornimmt (Milchsäuresenkung) wie bei den vorliegenden Versuchen, bei welchen die Tiere genügend mit Zucker gefüttert worden sind (Milchsäuresteigerung).* Das spricht dafür, daß die physiologische Wirkung des Insulins im Maß der vorhandenen Kohlehydrate zunimmt. *Kohlehydrathunger* (wie in der ersten Versuchsreihe) + Insulin ergibt keine physiologische, sondern *pathologische Wirkung.*

4. *Natriumlactat* wird in der Menge von 2 bis 2,5 g intravenös eingespritzt.

	Blutzucker Proz.	Blutmilchsäure Proz.
Kaninchen Nr. 63, 1750 g Gewicht.		
Vorher	0,143	0,072
10 Minuten nach 2 g Natriumlactat intrav.	0,160	0,130
1 Stunde „	0,110	0,130
2 Stunden „	0,131	0,070
Kaninchen Nr. 64, 1770 g Gewicht.		
Vorher	0,130	0,117
10 Minuten nach 2,5 g Natriumlactat	0,127	0,338
Kaninchen Nr. 65, 1320 g Gewicht.		
Vorher	0,118	0,074
15 Minuten nach 2 g Natriumlactat	0,250	0,331
Nach 1½ Stunden	0,222	—

5. *Insulin + Natriumlactat.* 1 Einheit Insulin, nach 1½ Stunden wird das Natriumlactat eingespritzt.

	Blutzucker Proz.	Blutmilchsäure Proz.
Kaninchen Nr. 66, 1770 g Gewicht.		
Vorher	0,116	0,043
Nach 1½ Stunden	0,056	0,042

Nach 2 Stunden traten die Insulinkrämpfe durch die Natriumlactateinspritzung rasch ein.

	Blutzucker Proz.	Blutmilchsäure Proz.
Kaninchen Nr. 69, 1950 g Gewicht.		
Vorher	0,174	0,048
Nach 1½ Stunden, gleichzeitig Injektion von 1 g Natriumlactat	0,060	0,045
10 Minuten nach der Injektion	0,070	0,221
1 Stunde nach der Injektion	0,085	0,090
3 Stunden „ „ „	0,132	0,040

	Blutzucker Proz.	Blutmilchsäure Proz.
Kaninchen Nr. 70, 1750 g Gewicht.		
Vorher	0,124	0,135
Nach $1^1/_2$ Stunden traten Krämpfe ein, gleichzeitig werden 1,5 g Natriumlactat injiziert	0,035	0,052
10 Minuten nach der Injektion	0,063	0,389
$1^1/_2$ Stunden „ „ „	0,120	0,067
Kaninchen Nr. 71, 2250 g Gewicht.		
Vorher	0,136	0,055
Nach $1^1/_2$ Stunden, gleichzeitig wird 1 g Natriumlactat intravenös eingespritzt	0,063	0,045
10 Minuten nach der Injektion	0,110	—
$1^1/_2$ Stunden „ „ „	0,140	—
Kaninchen Nr. 72, 1870 g Gewicht.		
Vorher	0,146	0,023
Nach $1^1/_2$ Stunden, gleichzeitig wird 1 g Natriumlactat intravenös eingespritzt	0,058	0,016
10 Minuten nach der Injektion	0,083	—
$1^1/_2$ Stunden „ „ „	0,115	—
Kaninchen Nr. 74, 1790 g Gewicht.		
Vorher	0,116	0,039
Nach $1^1/_2$ Stunden traten Krämpfe ein, gleichzeitig wird 1 g Natriumlactat intravenös eingespritzt	0,040	0,019
10 Minuten nach der Injektion	0,077	0,201
$1^1/_2$ Stunden „ „ „	0,112	—

Aus dieser Versuchsreihe geht hervor, *daß bei der Behandlung mit Natriumlactat der Blutzucker steigt*, was darauf schließen läßt, daß die Milchsäuresalze gute Glykogenbildner sind. Hier bestätigen wir also die mit verschiedenartigen Methoden durchgeführten Versuche von *Embden*, *Parnas*, *Isaac* u. a. Außerdem haben wir festgestellt, daß die Krämpfe durch Natriumlactat aufgehoben werden können. In diesem Zusammenhang erscheint es angebracht, darauf hinzuweisen, daß man durch frühere Versuche festgestellt hat, daß das Calciumlactat eine Beruhigung der hypoglykämischen Krämpfe bewirkt, was man als Wirkung des Calciums bezeichnete. Es stellt sich aber nun heraus, daß vielmehr die aus den Lactaten entstehende Milchsäure die auftretenden Krämpfe zum Verschwinden bringt. Ferner geht hervor, daß die Blutzuckerkurve, die durch das Insulin gesenkt wird, durch die Milchsäure aufgehalten und wieder auf ihren normalen Höchststand gebracht wird.

6. *Acetaldehyd.* Acetaldehyd wird in der Menge von 1 ccm intravenös eingespritzt.

	Blutzucker	Blutmilchsäure	Blutaldehyd
Kaninchen Nr. 76, 1920 g Gewicht.			
Vorher	0,125	0,044	0,000
5 Minuten nach der Injektion	0,210	0,067	0,00218
1 Stunde nach der Injektion	0,176	0,049	0,000
$2^1/_4$ Stunden nach der Injektion	0,186	0,039	—
Kaninchen Nr. 77, 1720 g Gewicht.			
Vorher	0,129	0,049	—
15 Minuten nach der Injektion	0,184	0,042	—
45 „ „ „ „	0,181	0,034	—

7. *Acetaldehyd + Insulin.* 1 Einheit Insulin, nach 1½ Stunden wird 0,5 ccm Acetaldehyd eingespritzt.

	Blutzucker	Blutmilchsäure	Blutaldehyd
Kaninchen Nr. 79, 2420 g Gewicht.			
Vorher	0,120	0,031	—
Nach $1^1/_2$ Stunden, gleichzeitig Injektion	0,032	0,030	—
10 Minuten nach der Injektion	0,062	—	—
$1^1/_2$ Stunden „ „ „	0,084	0,115	—
Kaninchen Nr. 73, 1924 g Gewicht.			
Vorher	0,120	0,037	—
Nach $1^1/_2$ Stunden, gleichzeitig Injektion	0,046	0,023 (Insulinkrämpfe)	—

10 Minuten nach der Injektion von Acetaldehyd keine Krämpfe mehr.

Wie aus diesen Versuchen hervorgeht, übt der Acetaldehyd auf die hypoglykämischen Krämpfe eine glänzende Wirkung aus. Es greift also das Insulin nicht *nur* die Glucose, sondern auch ihre Spaltungsprodukte (Milchsäure, Acetaldehyd) an.

8. *Natriumacetat.* 1 g Natriumacetat wird intravenös eingespritzt.

	Vorher	Nach Injektion	
		15 Min.	45 Min.
Kaninchen Nr. 78, 1750 g Gewicht.			
Blutzucker	0,158	0,100	0,156

9. *Acetessigsäureäthylester.* Wir injizierten einem Kaninchen 1,0 g pro Kilogramm subkutan $^1/_{10}$ acetessigsaures Natrium.

	Vorher	$1^1/_2$ Stunden	3 Stunden	6 Stunden
Kaninchen Nr. 80, 2470 g Gewicht.				
Blutzucker	0,122	0,156	0,157	0,124
Blutmilchsäure	0,055	0,058	0,038	0,012
Gesamtaceton	0,000	0,007	0,003	0,000

Es werden 0,5 ccm acetessigsaurer Äthylester subkutan eingespritzt.

	Blutzucker	Blutmilchsäure	Blutacetessigsäure als Aceton
Kaninchen Nr. 81, 2000 g Gewicht.			
Vorher	0,134	0,044	0,00
Nach $1^1/_2$ Stunden	0,136	0,016	0,0012
„ 3 „	0,104	0,006	Spuren

Es werden 1,5 ccm acetessigsaurer Äthylester subkutan eingespritzt. Nach 1½ Stunden werden 10 Kanincheneinheiten Insulin gegeben.

	Blutzucker	Blutmilchsäure	Blutacetessigsäure als Aceton
Kaninchen Nr. 82, 1990 g Gewicht.			
Vorher	0,142	0,076	0,00
Nach $1^1/_2$ Stunden	0,142	0,034	0,0035
„ 3 „	0,077	0,035	0,00
Das Tier fühlte sich nach Insulin normal.			
Kaninchen Nr. 83, 2000 g Gewicht.			
Vorher	0,104	0,031	0,00
$1^1/_2$ Stunden nach der Acetessigsäureinjektion und gleichzeitig Injektion von 15 Einheiten Insulin subkutan	0,119	0,014	0,0033
Nach einer weiteren Stunde	0,146	0,021	0,00
Kaninchen Nr. 84, 2120 g Gewicht.			
Vorher	0,120	0,028	—
$1^1/_2$ Std. nach Injektion von 1,5 g acetessigsauren Äthylesters subkutan und gleichzeitig 10 Insulineinheiten	0,090	0,019	—
Nach einer weiteren Stunde	0,103	0,038	—

Diese Versuche kann man in vieler Hinsicht als *ein experimentelles Coma* bezeichnen, in welchem die Kaninchen von schwerer Schlafsucht befallen waren, eine tiefe Atmung und dabei einen starken Acetongeruch hatten, *welcher Zustand sehr rasch durch die Injektion von Insulin geändert wurde. Die Acetessigsäure allein verursachte eine Verminderung der Milchsäure, welche bis zu etwa 70 Proz. anstieg, während der Blutzucker auf gleicher Höhe verblieb bzw. höchstens eine leichte Senkung aufwies. Nach der Insulininjektion steigt die Milchsäure deutlich an, und der Blutzucker hat die paradoxe Neigung, anzusteigen.* Diese interessanten Befunde werden in dem Kapitel „Diskussion" näher beleuchtet werden. Besonders müssen wir auf die außerordentliche *Widerstandsfähigkeit* der mit acetessigsaurem Äthylester vergifteten Tiere *gegenüber dem Insulin* hinweisen (10 bis 15 Kanincheneinheiten Insulin auf einmal), was mit der außerordentlichen Aufnahmefähigkeit des Menschen für das Insulin im komatösen Zustande übereinstimmt.

10. *Lävulose.* 1 g Lävulose wird intravenös eingespritzt.

	Vorher	Nach Injektion	
		5 Minuten	1 Stunde
Kaninchen Nr. 86, 1730 g Gewicht.			
Blutzucker	0,137	0,208	0,129
Blutmilchsäure	0,062	0,030	0,038

(9 g per os.)

	Vorher	Nach Injektion	
		45 Minuten	$2^1/_2$ Stunden
Kaninchen Nr. 87, 1900 g Gewicht.			
Blutzucker	0,130	0,49	0,126
Blutmilchsäure	0,040	0,46	0,049

11. *Arabinose.* 1 g Arabinose wird in 15 ccm destillierten Wassers aufgelöst und intravenös gegeben.

	Vorher	Nach Injektion	
		5 Minuten	1 Stunde
Kaninchen Nr. 89, 1750 g Gewicht.			
Blutzucker	0,139	0,203	0,127
Blutmilchsäure	0,053	0,027	0,017

12. *Alanin.* 1 g Alanin wird in 10 ccm Wasser aufgelöst und intravenös gegeben.

	Vorher	Nach Injektion	
		20 Minuten	1½ Stunden
Kaninchen Nr. 90, 1900 g Gewicht.			
Blutzucker	0,134	0,151	0,146
Blutmilchsäure	0,051	0,035	0,046

1,5 g Alanin wird per os gegeben.

	Vorher	Nach Injektion	
		1 Stunde	2½ Stunden
Kaninchen Nr. 91, 1820 g Gewicht.			
Blutzucker	0,114	0,139	0,130
Blutmilchsäure	0,036	0,025	0,010

13. *Guanidin.* 0,180 g Guanidin werden intravenös gegeben.

	Vorher	Nach Injektion	
		20 Minuten	1½ Stunden
Kaninchen Nr. 92, 1800 g Gewicht.			
Blutzucker	0,133	0,129	0,130
Blutmilchsäure	0,074	0,051	0,039

0,300 g Guanidin werden intravenös gegeben.

	Vorher	Nach Injektion	
		½ Stunde	2 Stunden
Kaninchen Nr. 93, 2000 g Gewicht.			
Blutzucker	0,118	0,070	0,0110
Blutmilchsäure	0,050	0,031	0,020

Lävulose. Trotzdem die Lävulose ein guter Milchsäurebildner ist (*Isaac*), sinkt in einem Falle (intravenös) der Milchsäurewert bis um 50 Proz., während er im anderen Falle (per os) gleich bleibt. Zu gleicher Zeit steigt der Blutzucker ganz unbedeutend.

Alanin. Alanin, welches nach Fütterungsversuchen von *Neuberg* und *Langstein*[1]) sowie Leberdurchblutungsversuchen von *Embden* und *Kraus*[2]) ein vorzüglicher Milchsäurebildner ist, erwies sich bei unseren Blutuntersuchungen auf die Milchsäurebildung nicht günstig, sondern wirkte im Gegenteil auf diese hemmend ein. Inzwischen steigt der Blutzucker an.

Guanidin. Guanidin bewirkt die bekannte Senkung des Blutzuckers, welche mit einer gleichzeitigen Senkung der Blutmilchsäure verbunden ist. Krämpfe traten bei unseren Tieren, wegen der vielleicht zu klein gewählten Dosis nicht ein. Diese von uns durchgeführten Versuche betrachten wir als nicht genügend zahlreich, um allgemein gültige Schlüsse daraus ableiten zu können.

14. *Phlorrhizin.* Es werden 10 mg subkutan gegeben.

	Vorher	Nach Injektion	
		45 Minuten	2 Stunden
Kaninchen Nr. 63, 1920 g Gewicht.			
Blutzucker	0,129	0,150	0,139
Blutmilchsäure	0,057	0,022	0,049

	Vorher	Nach Injektion	
		1 1/2 Stunden	3 1/4 Stunden
Kaninchen Nr. 55, 1900 g Gewicht.			
Blutzucker	0,127	0,124	0,130
Blutmilchsäure	0,067	0,018	0,040

Es wird 1 Kanincheneinheit Insulin gegeben; nach 1 1/2 Stunden werden 10 mg Phlorrhizin subkutan eingespritzt.

	Vorher	Nach 1 1/2 Stunden	Nach einer weiteren 1/4 Stunde
Blutzucker	0,121	0,055	0,077
Blutmilchsäure	0,032	0,026	0,020

Nach Phlorrhizin zeigt der Blutzucker ein fast ständiges Gleichbleiben auf der normalen Höhe, *während die Blutmilchsäure um einen beträchtlichen Teil sinkt.* Eine plausible Erklärung dieser Erscheinung können wir jetzt noch nicht geben.

15. *Adrenalin.* 1 ccm 1 proz. Adrenalinlösung wurde subkutan eingespritzt.

	Vorher	Nach 1 Stunde	Nach 3 Stunden
Kaninchen Nr. 50, 1820 g Gewicht.			
Blutzucker	0,148	0,213	0,300
Blutmilchsäure	0,024	0,036	0,028
Kaninchen Nr. 51, 1850 g Gewicht.			
Blutzucker	0,132	0,313	0,353
Blutmilchsäure	0,038	0,047	0,032

[1]) *Neuberg* und *Langstein*, Verhandl. d. Berlin. Physiol. Ges. **1902/1903**, S. 114. — [2]) *Embden* und *Kraus*, diese Zeitschr. **45**, 1, 1912.

Es wird 1 Kanincheneinheit Insulin gegeben, nach 1½ Stunden wird 1 ccm 1proz. Adrenalinlösung gegeben.

	Vorher	1½ Stunden nach Insulin	1 Stunde nach Adrenalin
Blutzucker	0,109	0,050	0,168
Blutmilchsäure	0,032	0,017	0,015

Vor allem wird auf die ganz außergewöhnliche *Steigerung des Milchsäurewertes* nach Adrenalin hingewiesen und scheint daher diese Adrenalinwirkung bei gleichen Bedingungen nicht von einer größeren glykolytischen Fähigkeit zu sein als Insulin, trotz der starken glykogenolytischen Kraft.

16. *Hypophysin.* Es wird 1 ccm (Physoform) = 0,2 g Hypophysenhinterlappensubstanz gegeben.

	Vorher	Nach 25 Minuten	Nach 3 Stunden
Kaninchen Nr. 40, 1620 g Gewicht.			
Blutzucker	0,129	0,160	0,124
Blutmilchsäure	0,029	0,020	0,002

Es wird 1,5 ccm Physoform = 0,3 g frische Hypophysenhinterlappen substanz gegeben:

	Vorher	Nach 45 Minuten	Nach 3 Stunden
Kaninchen Nr. 41, 1950 g Gewicht.			
Blutzucker	0,136	0,137	0,161
Blutmilchsäure	0,047	0,008	0,008
Kaninchen Nr. 42, 1900 g Gewicht.			
Blutzucker	0,128	0,133	0,126
Blutmilchsäure	0,056	0,007	0,012

Es wird 1 Kanincheneinheit Insulin gegeben, nach 1½ Stunden wird 1 ccm Hypophysin gegeben.

	Vorher	Nach 1½ Stunden	Nach weiteren 10 Minuten
Kaninchen Nr. 43, 2000 g Gewicht.			
Blutzucker	0,126	0,067	0,075
Blutmilchsäure	0,055	0,025	0,061
Kaninchen Nr. 44, 2500 g Gewicht.			
Blutzucker	0,126	0,062	0,099
Blutmilchsäure	0,057	0,024	0,055
Kaninchen Nr. 45, 1740 g Gewicht.			
Blutzucker	0,106	0,026	0,104
Blutmilchsäure	0,032	0,020	0,021

Auf Grund dieser Resultate können wir ohne weiteres annehmen, *daß der Angriffspunkt des Hypophysenhinterlappens im Kohlehydratstoffwechsel in der Milchsäure gelegen ist.* Ganz besonders überraschend ist aber das Resultat, daß, wenn Hypophysin nach Insulin gegeben wird, die

Milchsäure anstatt, wie zu erwarten wäre, fällt, im Gegenteil bedeutend steigt. Es ist auch zu bemerken, daß die hypoglykämischen Krämpfe durch das Hypophysin zum Verschwinden gebracht werden.

Diskussion.

Insulin wirkt also nach den durchgeführten Versuchen auf die Blutmilchsäure verschieden, und zwar *setzt es beim nüchternen Tiere häufig den Wert herab, bei gleichzeitiger Zufuhr von Traubenzucker bewirkt es dagegen eine Milchsäurevermehrung.* Dieser zweite Fall entspricht der früher von *Collazo, Händel* und *Rubino*[1]) angewendeten Versuchsanordnung, wobei im Muskelbrei von mit Zucker gefüttertem Tiere durch Insulin eine Milchsäurevermehrung hervorgerufen wurde. Die von *Forster* und *Woodrow*[2]) gefundene Substanz, welche die Milchsäurebildung hemmt und aus Pankreasextrakt gewonnen wurde, und welche vom Insulin, Trypsin und Glyoxalase nach den Autoren verschieden ist, scheint somit nicht im Gegensatz zu unseren Ergebnissen am Hungertiere zu sein. Wir können sie also, unserer Meinung nach, als insulin*artige*, wenn auch nicht vollständig reine Stoffe betrachten. Wir fanden, daß die Mastixinsuline die Steigerung der Blutmilchsäure hervorrufen (zwei Versuche). Die Pikrininsuline dagegen verminderten den Gehalt der Blutmilchsäure. Wir können vielleicht annehmen, daß *die jetzigen Insuline keine reinen Substanzen sind*, und ihre Wirkung kann von einigen Bestandteilen abhängen. Einige von ihnen könnten die Steigerung der Blutmilchsäure hervorrufen, die anderen vielleicht dagegen die Verminderung derselben. Die sichere Beantwortung dieser Frage muß durch weitere Forschungen, insbesondere die nähere chemische Definierung des Insulins erfolgen.

Dieses oben erwähnte Phänomen der Milchsäureverminderung im Kohlehydrathunger erwies sich als sehr regelmäßig und scheint ihm ein bestimmtes Gesetz zugrunde zu liegen. Wir befinden uns damit im Gegensatz zu *Briggs, Koechig, Doisy* und *Weber*[3]), welche gefunden haben, daß bei hungernden Hunden durch Insulin eine Milchsäurevermehrung im Blute verursacht wird. Die Autoren glaubten, diese Vermehrung entspräche direkt dem Absinken des Blutzuckers. Im Gegensatz dazu beobachteten wir eine, wenn auch nicht ganz, aber fast parallel laufende Senkung beider Kurven. Vermutlich haben wir das nach gleicher Methode hergestellte Insulin wie die Autoren verwendet (*Collip*sche und Pikratreinigung). Zur Erklärung wollen wir

---

[1]) *Collazo, Händel* und *Rubino*, Klin. Wochenschr. Nr. 8, 1924; Deutsch. med. Wochenschr. Nr. 23, 1924.

[2]) *Forster* und *Woodrow*, The Biochem. Journ. **18**, 5, 1924.

[3]) *Briggs, Koechig, Doisy* und *Weber*, Journ. of. biol. Chem. **58**, 1924.

folgendes ausführen: Wie *Collazo, Händel* und *Rubino* schon in der früheren Arbeit geschrieben haben, setzt das Insulin sowohl beim Glykogenaufbau wie auch beim Kohlehydratabbau ein, und zwar zunächst an der anoxybiotischen, aber auch an den weiteren oxybiotischen Phasen des Kohlehydratabbaues [s. darüber *Neuberg, Gottschalk* und *Strauss*[1]) sowie *Neuberg* und *Gottschalk*[2]) u. a.]. Es ist nochmals zu bemerken, daß Aufbau- und Abbauvorgänge eng miteinander verknüpft sind, besonders beim Muskelstoffwechsel (*Meyerhof*).

Die von uns beobachtete Milchsäureverminderung im Blute durch Insulin kann also auf doppelte Weise zustande gekommen sein: Einerseits kann es sich um die weitere Zerstörung der Milchsäure, also um das Überwiegen der Abbauvorgänge handeln, andererseits um das Eingreifen in den Rückaufbau zu Glykogen.

Beide Phänomene müssen zum Schwinden der Milchsäure führen. Wir müssen dabei bemerken, daß die Verbrennung der Milchsäure als nicht ganz sicher erwiesen zu betrachten ist (*Meyerhof*). Nach *Neuberg* und Mitarbeitern gehört auch die Milchsäure zu den schlechten Acetaldehydbildnern. Dies würde gegen den direkten oxydativen Abbau sprechen. Möglicherweise bildet sich zuerst aus der Milchsäure und des organisch verbundenen Phosphors in der ersten Phase der Insulinwirkung Lactacidogen (Hexosediphosphorsäure), das nach den Feststellungen der Schule *Neubergs* ein ausgezeichneter Acetaldehydbildner ist.

Wie aus diesen Ausführungen hervorgeht, *braucht das Insulin zu seiner physiologischen Auswirkung Zucker* — die Hungerversuche entsprechen nicht den physiologischen Verhältnissen. Deshalb lassen sich auch, wie *Falta*[3]) meint, die Wirkungen des Insulins am Diabetiker studieren, der eben über die genügende Zuckermenge verfügt.

Glucose und ihre Spaltungsprodukte — Acetaldehyd, Milchsäure — haben eine steigernde Wirkung auf den Blutzucker. *Nur Glucose bewirkt eine deutliche Steigerung der Blutmilchsäure*, die anderen Stoffe wirken nicht in eindeutiger Weise. *Glucose mit Insulin zusammen erhöht* — wie oben erwähnt — *trotz des leichten Sinkens des Zuckers die Blutmilchsäure*. Durch Glucosezufuhr wird offenbar dem Organismus mehr Material zur Milchsäurebildung zur Verfügung gestellt und gleichzeitig auch die Abbauvorgänge angeregt im Gegensatz zu einer einfachen Überschwemmung. Diese Tatsachen decken sich mit den Be-

[1]) *Neuberg, Gottschalk* und *Strauss*, Deutsch. med. Wochenschr. Nr. 45, 1923.
[2]) *Neuberg* und *Gottschalk*, diese Zeitschr. **146**, 164, 1924.
[3]) *Falta*, Klin. Wochenschr. Nr. 31, 1924.

funden beim Menschen, normalen und Diabetikern, und ergeben sich bei Diabetikern gegenüber dem gesunden Menschen nur graduelle Unterschiede [*Collazo* und *Lewicki*[1])]. Aber auch beim zuckerkranken Menschen findet nur nach Zuckerzufuhr eine *rasche höhere und längere* Milchsäuresteigerung statt.

Nachdem bei den im Hungerzustand mit Insulin behandelten Tieren eine Abnahme der Blutmilchsäure beobachtet wurde, kann man dieses Phänomen als eine *Umkehrung der Glykolysis* bezeichnen. Vor der Entdeckung des Insulins betrachtete ein bekannter französischer Diabetisforscher [*Lepine*[2])] die innere Sekretion des Pankreas als ein Verstärkungsmittel der Glykolyse.

Unsere vorliegenden Versuche an lebenden Tieren als auch die früheren Versuche kanadischer Entdecker[3]) dieses Hormons *in vitro* ergeben den Beweis, daß das *Insulin keinerlei Wirkung auf die Blutglykolyse ausübt.* [Wie durch die Schüler *Embdens, v. Noorden jun., Kondo* und *Kraske*[4]) angegeben ist, stellt die Glykolyse nichts anderes dar als eine fast äquimolekulare Umwandlung des Traubenzuckers in Milchsäure.]

Lävulose, Arabinose und *Alanin* setzten wider Erwarten die Milchsäure um ungefähr 30 Proz. herab, während gleichzeitig der Blutzucker leicht ansteigt. Die Erklärung dieser Erscheinung scheint uns nicht einfach. Diese Stoffe verhalten sich offenbar ganz anders als die Glucose.

Natriumacetat führt zu keiner Blutzuckersteigerung, was für das Überwiegen des Abbaues (zu Essigsäure, CO_2 und H_2O) über Aufbauvorgänge spricht, wie dies bei den früher erwähnten Stoffen der Fall ist.

Wir führten auch einige Versuche mit *acetessigsaurem Ester durch, wobei sich eine Milchsäureverminderung bis zu 50 Proz. ergab.* Dieses experimentelle Ergebnis kommt sehr überraschend, wenn man es mit der Rolle der Acetessigsäure beim Diabetiker und ihrem gegensätzlichen Verhalten zu der Milchsäure vergleicht. *Es ist eine Eigentümlichkeit des Pankreasdiabetes, daß die Bildung der Acetessigsäure zu einer Verminderung der Milchsäure führt* [*Embden* und *Isaac*[5])]. Die Konkurrenz dieser physiologischen Milchsäure mit der pathologischen produktiven Acetessigsäure zählt zu den interessantesten biochemischen Störungen des intermediären Stoffwechsels des Diabetikers. Unsere Versuche bilden in dieser Hinsicht eine weitere Stütze. Wenn man gleichzeitig mit

---

[1]) *Collazo* und *Lewicki*, Deutsch. med. Wochenschr. 1924 (im Druck).
[2]) *Lepine*, Le Diabète Sucré, S. 159. Paris 1909.
[3]) *Eadie, Mac Leod* und *Noble*, Amer. Journ. of Physiol. **65**, 462, 1923.
[4]) *Embden* und Mitarbeiter, diese Zeitschr. **45**, 1 bis 207, 1912.
[5]) *Embden* und *Isaac*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **99**, 297, 1917.

acetessigsaurem Ester Insulin einspritzt, ändert sich das Bild, das Insulin bewirkt eine Steigerung der Milchsäure und der Blutzucker geht auf die normale Höhe zurück. Dies stimmt mit den klinischen Befunden bei schweren Diabetikern überein, wo eine ziemlich rasche Unterdrückung der Acidosis mit einer nicht sofort einsetzenden Verminderung des Blutzuckers festgestellt wurde [*v. Noorden*[1]), *Umber*[2]), nach *Widal*[3]) die sogenannte „dissoziierte" Wirkung des Insulins, *Thannhauser* und *Mezger*[4])].

Bei Guanidinvergiftung ergaben sich keine deutlichen Veränderungen, lediglich eine leichte Senkung der Milchsäure und des Blutzuckers, welche nach einer stärkeren Dosis deutlicher erkennbar wird.

Adrenalin bildet auch hinsichtlich der Milchsäure einen diametralen Gegensatz zu Insulin wie auch in anderer Beziehung. In diesem Falle scheint die *Milchsäurevermehrung* im Blute mit der Glykogenmobilisierung Hand in Hand zu gehen. Es dürften beim Verschwinden des Glykogens *nicht nur Zucker, sondern auch andere Produkte, und zwar Milchsäure,* zur Bildung gelangen. *Die Milchsäure entsteht hier sowohl in der Leber als auch in den Muskeln und gelangt von dort in das Blut, und im verstärkten Maße dann, wenn irgend eine Reizung des Kohlehydratstoffwechsels besteht.*

Wie ist das auffallende Phänomen, das wir *nach Hypophysin* zu beobachten Gelegenheit hatten, zu erklären? Es handelt sich um die Kreuzung der beiden Kurven, der Blutzuckerkurve und *der Milchsäurekurve, die sehr beträchtlich abfällt.* Diese Tatsachen müssen wir als einen neuen Beitrag zur Physiologie der Hypophysenwirkung verzeichnen. Sie bildet einen Hinweis auf den Angriffspunkt des Hypophysenhinterlappens und ein bestimmtes Glied in der Kette der Abbaustufen des Kohlehydratstoffwechsels. Die Ergebnisse sind so auffallend, daß man sagen kann, daß *sich das Hypophysin zur Blutmilchsäure wie das Insulin zum Blutzucker verhält.* Merkwürdigerweise wirkt die Kombination von Insulin und Hypophysin hemmend auf die senkende Wirkung des Hypophysins ein, während der Blutzucker nicht oder höchstens leicht steigt.

Blutzucker und Milchsäure gehen — wie aus dieser ganzen Arbeit hervorgeht — *nicht immer parallel.* Inwieweit man aus den Werten der Blutmilchsäure auf den Kohlehydratstoffwechsel schließen kann,

---

[1]) *Noorden* und *Isaac*, Klin. Wochenschr. Nr. 43, 1923; Nr. 17, 1924.
[2]) *Umber*, Med. Klinik Nr. 32, 1923.
[3]) *Widal*, La Presse Medical 1924.
[4]) *Thannhauser* und *Mezger*, Klin. Wochenschr. Nr. 44, 1924.

wagen wir noch nicht zu entscheiden. Unsere Versuche betrachten wir als die ersten Ansätze zur weiteren Klärung dieser wichtigen Fragen.

Vielleicht wird es sich zeigen, *daß man von einem Milchsäurestoffwechsel als solchem sprechen kann.* Es wäre also die Milchsäure nicht nur eine Zwischenstufe, sondern als ein wichtiger, für sich selbst Bedeutung besitzender Stoff zu betrachten, dem man ebenso eine wichtige Stellung in der Physiologie und Pathologie zuschreiben muß.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

Nr. 70.

Über experimentelle Kohlehydratverarmung und den Kohlehydratstoffwechsel des Gehirns.

Von

Kiichi Takahashi.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 29. November 1924.)

Bei zwei Entdeckungen der jüngsten Zeit von großer Bedeutung, nämlich dem Insulin und der Symptomatologie des leberlosen Hundes, ist eine Erscheinung zutage getreten, welche von hohem Interesse ist und von seiten der Physiologie noch sehr der Aufklärung bedarf. Diese Erscheinung ist die Hypoglykämie. Überlegt man sich den Sachverhalt, so erscheint es einigermaßen rätselhaft, daß das einfache Fehlen von Zucker im Blute so schwere Symptome in recht kurzer Zeit hervorruft. Die Schwierigkeit wird dadurch nicht behoben, daß, wie der Versuch zeigt, die einfache Injektion von Traubenzucker die schwersten Symptome in der allerkürzesten Zeit beseitigt. Alles lehrt nur, daß tatsächlich der Zuckermangel das Anfangsglied der Kette ist.

Die beiden Hauptmethoden, Hypoglykämie zu erzeugen, sind, wie schon gesagt, die Injektion von Insulin und die Herstellung eines leberlosen Hundes. Es kann nach Analogie an die Möglichkeit gedacht werden, durch Anwendung einer weiteren Methode der experimentellen Hypoglykämie etwas mehr Material herbeizuschaffen, um den Einblick in den hypoglykämischen Symptomenkomplex zu fördern. Eine solche Methode war durch eine Reihe von Arbeiten aus dem Berner physiologischen Institut angebahnt worden, weshalb ich der Aufforderung von Prof. *Asher* folgte, mit einer neuen Methode Tiere in den hypoglykämischen und kohlehydratarmen Zustand zu bringen. Dadurch schien die Möglichkeit geboten, die Folgezustände einer neuen Art

von Hypoglykämie kennenzulernen. Darüber hinaus übernahm ich aber noch eine weitere Aufgabe, die man als im engsten Zusammenhang mit dem hypoglykämischen Symptomenkomplex stehend denken könnte. Es scheint aber, daß an diese von mir gemeinte Aufgabe noch nicht herangetreten wurde. Der hypoglykämische Symptomenkomplex legt es nahe, an das Zentralnervensystem zu denken, und daraus entsteht die Aufgabe, zu untersuchen, wie es sich mit dem Kohlehydratgehalt des Zentralnervensystems während der Hypoglykämie verhält. Der Lösung dieser Aufgabe habe ich mich in der nachfolgenden Arbeit ganz besonders gewidmet.

Voraussetzung für die Lösung dieser Aufgabe wäre eine Kenntnis des Glykogen- und Kohlehydratgehalts des Zentralnervensystems. In der mir zugänglichen Literatur findet sich hierüber so gut wie gar nichts. Im biochemischen Handlexikon[1]) zählen *Neuberg* und *Rewald* in ihrem Artikel „Glykogen“ Glykogen in sehr zahlreichen Organen als vorkommend auf, unter Beibringung der Literatur. Aber das Zentralnervensystem wird nicht erwähnt, allerdings machen sie die Angabe, daß es fast in keiner Zelle fehlt. Einen neueren Aufsatz über das Glykogen hat im 10. Bande des genannten Handlexikons im Jahre 1923 *Zemplén* verfaßt. In dem „Vorkommen“ wird das Zentralnervensystem nicht genannt. In *Hammarstens* bekanntem Lehrbuch[2]) ist unter Glykogen kein Vermerk über sein Vorkommen im Zentralnervensystem, und in dem großen Kapitel über Gehirn und Nerven fehlt jede Erwähnung von Glykogen, und in einer Tabelle der Zusammensetzung des Menschengehirns figurieren weder Glykogen noch Kohlehydrate. Nur vom Cerebron wird angegeben, daß es bei der Hydrolyse Galaktose liefere. Diese Literaturangaben machen natürlich keinen Anspruch auf Vollständigkeit; sie lassen aber jedenfalls erkennen, daß schwerlich bisher dem Kohlehydratgehalt des Zentralnervensystems eine große Bedeutung beigemessen wird. Dementsprechend ist auch wenig die Rede gewesen von einem Kohlehydratstoffwechsel des Zentralnervensystems. Nur *Winterstein* und seine Mitarbeiter[3]) haben Untersuchungen über den Zuckerstoffwechsel der nervösen Zentralorgane angestellt, ausgehend von der Betrachtung des respiratorischen Gaswechsels des Zentralnervensystems. Es handelt sich hierbei um den Nachweis, daß zugesetzter Traubenzucker umgesetzt wird und daß dieser Umsatz von der Lebenstätigkeit und dessen Intensität abhängig ist. Diese

---

[1]) Biochemisches Handlexikon, herausgegeben von *Abderhalden* **2**. Berlin, Julius Springer, 1911.

[2]) *O. Hammarsten*, Lehrb. d. physiol. Chem., 9. Aufl. München und Wiesbaden, I. F. Bergmann, 1921.

[3]) *E. Hirschberg* und *H. Winterstein*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **100**, 185, 1917.

Untersuchungen wurden am isolierten Zentralnervensystem des Frosches gemacht. So beachtenswert diese Feststellungen sind, so können sie doch nicht den Einblick ersetzen, den ein Umsatz von im Zentralnervensystem präformiertem Kohlehydrat unter wechselnden Bedingungen gewähren würde.

Meine Untersuchungen wurden an Ratten und Kaninchen angestellt.

Ich beschreibe zunächst die von mir benutzten chemischen Methoden, um den Kohlehydratgehalt der Muskeln, der Leber und des Gehirns von Ratten zu bestimmen. Im wesentlichen habe ich mich bei der Gewebebehandlung an die neuere Beschreibung von *Meyerhof*[1]) gehalten. Das Tier wurde möglichst schnell durch Köpfung getötet und das hierbei abfließende Blut für die Blutzuckerbestimmung verwertet. Von Muskeln wurden 2 bis 5 g der Oberschenkelmuskulatur genommen. In einer Voruntersuchung habe ich verglichen, ob es ein Unterschied im Glykogen und Kohlehydratgehalt zwischen der rechten und linken Seite gibt, wobei ich fand, daß der Unterschied sehr gering sei. Deshalb halte ich es für berechtigt, in symmetrischen Muskeln die gleiche Kohlehydratmenge zugrunde zu legen. Bei der Leber habe ich aus verschiedenen Teilen derselben kleine Stückchen genommen, insgesamt etwa 2 bis 5 g. Bei der Untersuchung des Zentralnervensystems habe ich das ganze Gehirn, Groß- und Kleinhirn, entnommen und diese gesamte Menge verarbeitet. Nur in einem Punkte habe ich bei der Bestimmung der übrigen Kohlehydrate zur Enteiweißung die von *Meyerhof* beschriebene Methode für meine Zwecke modifiziert. Diese Modifikation sei kurz beschrieben. Ein 60proz. Alkoholextrakt wird in einem Porzellanschälchen eingedampft. Danach wird etwa $\frac{1}{3}$ Volumen destillierten Wassers zugesetzt und bis zur Vertreibung des gesamten Alkohols auf dem Wasserbade eingedampft. Hierdurch kommt es zu einer Eiweißkoagulation. Die Masse wird durch ein kleines Faltenfilter filtriert. Nach wiederholtem Auswaschen mit kochend heißem destillierten Wasser werden zum Filtrat einige Tropfen 5proz. Essigsäure, etwa ein halber Eßlöffel Talkum und 3 ccm Äther pro 50 ccm Extrakt zugesetzt. Der Extrakt wird noch einmal auf dem Wasserbade eingedampft, um die Fette und die Reste des Eiweißes niederzuschlagen. Die Erwärmung geschieht elektrisch unter Vermeidung einer offenen Flamme. Die Lösung wird durch ein kleines Filter filtriert und mit destilliertem Wasser wiederholt gewaschen. Das ganz klare Filtrat erweist sich, mit Sulfosalicylsäure geprüft, als vollständig eiweißfrei. Die von mir angewandte Modifikation erspart viel lästige Arbeit, so z. B. die Durchleitung von Schwefelwasserstoff und die nachherige Durchlüftung, und verkürzt die Dauer des Versuchs.

Nachfolgende Tabelle gibt einen Vergleich der erhaltenen Werte für freie Kohlehydrate nach *Meyerhofs* Methode und nach meiner Modifikation derselben.

Versuchsnummer	Datum	Nach *Meyerhofs* Methode mg pro g Muskel	Nach meiner Methode mg pro g Muskel
1	12. II.	2,03	2,36
2	19. II.	1,63	1,75
3	25. II.	1,71	1,82

[1]) *Meyerhof*, Pflügers Arch. 185, 75.

Meine Modifikation ergibt 6,2 bis 14 Proz. mehr freie Kohlehydrate als die ursprüngliche Methode von *Meyerhof*. Der Vergleich wurde so angestellt, daß ich einen Extrakt mit 60proz. Alkohol von 10 g Muskel machte. Der Extrakt wird im Meßkolben auf 100 ccm gebracht, und es wurden je 50 ccm getrennt nach den beiden Methoden verarbeitet.

Nach der Inversion mit Salzsäure zur Ermittlung des Glykogens und der übrigen Kohlehydrate habe ich zur Mikrozuckerbestimmung die Methode von *Folin-Wu* angewandt, wobei ich mich an die Originalvorschriften der Autoren (s. z. B. *Mandel* und *Steudel*, Mikrometrische Methoden) gehalten habe. Von Zeit zu Zeit wurde die zur Vergleichung dienende Stammlösung zur Kontrolle mit dem Polarisationsapparat bestimmt[1]). Meine erste Versuchsreihe wurde an mit Brot und Milch gefütterten normalen Ratten angestellt. Ich bestimmte den Kohlehydratgehalt der Leber, der Muskeln und des Gehirns. Ferner habe ich vor der Tötung der Tiere den Zuckergehalt des Blutes bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuche finden sich in Tabelle I.

Das durchschnittliche Ergebnis von fünf Tieren ist das nachfolgende: Pro 1 g Leber 37,44 mg Gesamtkohlehydrate, wovon 23,05 mg Glykogen, 8,39 mg übrige Kohlehydrate; pro 1 g Muskel 8,09 mg Gesamtkohlehydrate, wovon 6,03 mg Glykogen, 2,06 mg übrige Kohlehydrate; pro 1 g Gehirn 1,23 mg Gesamtkohlehydrate, wovon 0,75 mg Glykogen, 0,48 mg übrige Kohlehydrate. Der Zuckergehalt des Blutes betrug 1,25 mg pro 1 ccm Blut. Was die Zahlen für die Leber und den Muskel betreffen, so bewegen sich dieselben innerhalb normaler mittlerer Grenzen. Besonderes Interesse beansprucht der Wert für den Kohlehydratgehalt des Gehirns. Er entspricht etwa demjenigen des Blutes. Wie bei den übrigen Geweben, verteilt sich der Gesamtkohlehydratgehalt auf zwei verschiedene Zuckerarten. Die eine habe ich als Glykogen bezeichnet, weil der Wert mit Hilfe der *Pflüger*schen Methode der Glykogenbestimmung erhalten wurde. Es wird noch darüber zu sprechen sein, inwiefern dies berechtigt ist. Jedenfalls liegt der Nachweis vor, daß im Gehirn eine Vorstufe vorhanden ist, welche nach der Behandlung mit der *Pflüger*schen Methode und der Säureinvertierung freies Kohlehydrat liefert.

In meiner nächsten Versuchsreihe habe ich Ratten nach der im Berner physiologischen Institut üblichen Methode mit Wittepepton gefüttert, was ich in Form von Kugeln gereicht habe, außerdem wurden die Tiere reichlich mit Wasser versorgt. Ein Zusatz von ganz wenig Brot zum Formen der Kugeln erwies sich als nützlich. Das von *Tschannen* entdeckte Symptom der Peptonwirkung trat vom zweiten Tage an auf; der Harn nahm durch Gallenfarbstoff eine tiefgrüne Färbung an. Das Ergebnis meiner Versuche s. auf Tabelle II.

Das Ergebnis dieser Versuchsreihe tritt am klarsten darin hervor, wenn man die erhaltenen Durchschnittswerte mit denjenigen bei

---

[1]) Siehe auch *M. Kobayashi*, Zeitschr. f. Biol. 81, 263, 1924.

Tabelle 1.

Datum 1924	Nummer und Geschlecht des Tieres	Körpergewicht des Tieres g	Arten der Kohlehydrate	Kohlehydratgehalt mg pro g Gewebe			Blutzuckergehalt mg pro ccm Blut	Gewicht der Leber und des Gehirns g	Bemerkungen
				Leber	Muskel	Gehirn			
12. II	1 ♀	263	Glykogen	17,64	7,27	0,64	1,27	13,5	Mit Brot und Milch gefüttert
			Übrige Kohlehydrate . .	5,94	2,36	0,29		1,4	
			Summe d. Kohlehydrate	23,58	9,63	0,93			
14. II	2 ♂	248	Glykogen	20,76	4,63	0,83	1,08	12,4	Dasselbe
			Übrige Kohlehydrate . .	6,15	1,43	0,41		1,3	
			Summe d. Kohlehydrate	26,91	6,06	1,24			
19. II	3 ♂	170	Glykogen	30,30	5,55	0,86	1,58	9,2	Dasselbe
			Übrige Kohlehydrate . .	10,21	1,75	0,78		1,5	
			Summe d. Kohlehydrate	40,51	7,30	1,64			
22. II	4 ♀	173	Glykogen	21,89	5,94	0,62	1,14	6,8	Dasselbe
			Übrige Kohlehydrate . .	7,05	2,92	0,35		1,5	
			Summe d. Kohlehydrate	28,94	8,86	0,97			
25. II	5 ♀	245	Glykogen	24,65	6,78	0,79	1,19	10,2	Dasselbe
			Übrige Kohlehydrate . .	12,58	1,82	0,58		1,6	
			Summe d. Kohlehydrate	37,23	8,60	1,37			
Durchschnitt . . .		220	Glykogen	23,05	6,03	0,75	1,25	8,6	
			Übrige Kohlehydrate . .	8,39	2,06	0,48		1,5	
			Summe d. Kohlehydrate	31,44	8,09	1,23			

Tabelle II.

Datum 1924	Nummer und Geschlecht des Tieres	Körpergewicht bei Beginn der Fütterung und unmittelbar v. der Tötung	Einverleibung des Präparats	Arten der Kohlehydrate	Kohlehydratgehalt mg pro g Gewebe			Blutzuckergehalt mg pro ccm Blut	Gewicht der Leber und des Gehirns g	Bemerkungen
					Leber	Muskel	Gehirn			
4. III.	6 ♀	214	Am 29. III. 7 g Pepton und ganz wenig Brot. Am 1., 2., 3. III. 8 g Pepton und ganz wenig Brot. (Jeden Tag Wasser).	Glykogen	1,34	3,16	0,72	1,04	7,5	Vom zweiten Tage an eine tiefgrüne Färbung d. Harnes auf Gallenfarbstoff
		185		Übrige Kohlehydrate .	3,53	1,55	0,25		1,6	
		(—29)		Summe d. Kohlehydrate	4,87	4,71	0,97			
10. III.	8 ♂	195	Am 5. III. 6 g Pepton und ganz wenig Brot. Am 6., 7., 8. III. 7 g Pepton und ganz wenig Brot. Am 9. III. 5 g Pepton und ganz wenig Brot.	Glykogen	0,42	3,08	0,48	0,91	7,1	Dasselbe
		165		Übrige Kohlehydrate .	2,81	1,08	0,19		1,5	
		(—30)		Summe d. Kohlehydrate	3,23	4,15	0,67			
21. III.	14 ♀	210	Am 18., 19. III. 8 g Pepton und ganz wenig Brot. Am 20. III. 9 g Pepton und ganz wenig Brot. (Jeden Tag Wasser).	Glykogen	3,97	4,64	0,86	0,92	8,1	Dasselbe
		197		Übrige Kohlehydrate .	3,58	1,28	0,33		1,6	
		(—13)		Summe d. Kohlehydrate	7,55	5,92	1,19			
Durchschnitt		206		Glykogen	1,15	3,63	0,69	0,95	7,6	
		182		Übrige Kohlehydrate .	3,31	1,30	0,26		1,6	
		(—24)		Summe d. Kohlehydrate	4,46	4,93	0,95			

Wenn man diesen Durchschnitt mit dem bei normalen Tieren vergleicht, ergibt sich folgende Tabelle:

Arten der Kohlehydrate	Abnahme							
	Leber		Muskel		Gehirn		Blutzucker	
	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.
Glykogen	21,90	95,1	2,4	39,8	0,06	8,0	—	—
Übrige Kohlehydrate	5,08	60,5	0,76	36,9	0,22	45,8	0,30	24
Summe der Kohlehydrate . . .	26,98	85,8	3,16	39,1	0,28	22,7	0,30	24

normalen Tieren vergleicht und aus der Abnahme — um eine solche handelt es sich nämlich — die prozentischen Abnahmen berechnet. Es findet sich auf diese Weise, daß in der Leber das Glykogen um 95,1 Proz., die übrigen Kohlehydrate um 60,5 Proz., die Summe der Kohlehydrate um 85,5 Proz. abgenommen hatten. Für den Muskel betrugen die Abnahmen an Glykogen 39,8 Proz., an den übrigen Kohlehydraten 36,9 Proz. und an der Summe der Kohlehydrate 39,1 Proz. Am Gehirn betrug die als Glykogen ausgedrückte Abnahme nur 8 Proz., an den übrigen Kohlehydraten 45,8 Proz., an der Gesamtheit der Kohlehydrate 22,7 Proz. Pepton allein bedingt, wie schon durch die Arbeit von *Tschannen* bekannt war, praktisch eine fast vollständige Abnahme des Glykogens der Leber, und auch die Gesamtkohlehydrate sind auf einen sehr niedrigen Wert heruntergekommen. Auch der Kohlehydratgehalt des Muskels hat sich vermindert, wenn auch nicht in dem Umfange wie in der Leber. Der Befund kann so gedeutet werden, daß den Muskeln nicht mehr das Ersatzdepot der Leber zur Verfügung steht. Auch der Blutzuckergehalt hat etwas abgenommen, nämlich um 24 Proz. Bei weitem das bemerkenswerteste Resultat ist aber die Tatsache, daß der „Glykogengehalt" des Gehirns so gut wie gar nicht sich vermindert hatte.

In der nächsten Versuchsreihe habe ich die Fütterung mit Pepton kombiniert mit der Injektion von Phlorrhizin, um durch diesen Doppeleingriff die Kohlehydratverarmung des Tieres noch weiter zu steigern. *Merck*sches Phlorrhizin wurde, wie *Lusk* es angibt, nach der Methode von *Coolen* injiziert[1]). Den Tieren wurde wegen der Phlorrhizininjektionen noch reichlicher Wasser gegeben als vorher. Nur im Anfang wurden große Mengen von Pepton gegeben, nachher aber kleinere Mengen, und als Ersatz dafür gut ausgekochtes, möglichst kohlehydratarmes Rindfleisch gegeben. Die erzielte Glykosurie habe ich nach der Mikrozuckerbestimmungsmethode von *Folin* und *Wu* ermittelt. Im Laufe der Versuche wurden unter dieser Behandlung die Tiere schwach. Es ließ sich aus dem Symptomenbild nicht erschließen, ob diese Schwächung auf der Schädigung der Leber durch Pepton, welche an der starken Gallenfärbung des Harns erkenntlich war (der Grad derselben ist auf der Tabelle IIIa durch die Zahl der Kreuze vermerkt), oder durch den Kohlehydratmangel herbeigeführt wurde. Ich neige auf Grund der bisherigen Erfahrungen zu ersterer Annahme.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe finden sich in Tabelle III und Tabelle IIIa.

Auf Grund von drei Versuchen ergeben sich folgende Mittelwerte. In der Leber hat das Glykogen um 99,7 Proz., haben die übrigen Kohle-

---

[1]) *Gr. Lusk*, Ergebn. d. Physiol. 1912, S. 375 und 329.

Tabelle III.

Datum 1924	Nummer und Geschlecht des Tieres	Körpergewicht bei Beginn der Fütterung und unmittelbar vor der Tötung	Arten der Kohlehydrate	Kohlehydrate mg pro g Gewebe: Leber	Muskel	Gehirn	Blutzuckergehalt mg pro ccm Blut	Gewicht der Leber und des Gehirns g	Bemerkungen
13. III.	10 ♀	220	Glykogen	0,19	0,05	0,63	0,37	4,5	Mit Pepton 8 Tage gefüttert, 2 mal Phlorrhizin injiziert
		167	Übrige Kohlehydrate . . .	0,66	1,03	0,21		1,7	
		(—53)	Summe der Kohlehydrate .	0,85	1,08	0,84			
17. III.	11 ♀	223	Glykogen	Spur	0,09	1,48	0,25	6,0	Mit Pepton 7 Tage gefüttert, 2 mal Phlorrhizin injiziert
		178	Übrige Kohlehydrate . . .	0,74	0,69	0,17		1,8	
		(—45)	Summe der Kohlehydrate .	0,74	0,78	1,65			
19. III.	12 ♂	199	Glykogen	0,06	0,11	0,62	0,42	6,5	Mit Pepton 4 Tage gefüttert, 1 mal Phlorrhizin injiziert
		158	Übrige Kohlehydrate . . .	1,78	1,59	0,54		1,8	
		(—41)	Summe der Kohlehydrate .	1,84	1,70	1,16			
Durchschnitt . .		214	Glykogen	0,08	0,08	0,91	0,35	56,7	
		168	Übrige Kohlehydrate . . .	1,06	1,10	0,31		1,8	
		(—46)	Summe der Kohlehydrate .	1,14	1,18	1,22			

Wenn man diesen Durchschnitt mit dem bei normalen Tieren vergleicht, ergibt sich folgende Tabelle:

Arten der Kohlehydrate	Abnahme: Leber mg	Leber Proz.	Muskel mg	Muskel Proz.	Gehirn mg	Gehirn Proz.	Blutzucker mg	Blutzucker Proz.
Glykogen	22,97	99,7	5,95	98,7	0,16	21,3	—	—
Übrige Kohlehydrate	7,33	87,4	0,96	46,6	0,17	35,4	0,90	72,0
Summe der Kohlehydrate . . .	30,30	96,4	6,91	85,4	0,01	0,8	0,90	72,0

Tabelle IIIa.

Nr. des Tieres	Datum 1924	Körpergewicht g	Einverleibung des Präparats	Harn				Bemerkungen
				Menge	Gehalt d. reduzierten Substanz Proz.	Gallenfarbstoff	Eiweiß	
10	5. III.	220	6 g Pepton, 1 g Brot			—	—	Am 11. III. etwas tobsüchtig
	6. III.	200	8 g „ 2 g Fleisch			+	+	
	7. III.	194	8 g „ 2 g „			++	+	Am 12. III. auch wie vorher
	8. III.	185	8 g „ 2 g „			+	—	
	9. III.	186	6 g „ 5 g „			+	—	Am 13. III. nachmittags ganz schwach, um 6 Uhr getötet
	10. III.	185	3 g „ 8 g „					
			0,05 g Phlorrhizin	15	4,68	—	—	
	11. III.	177	2 g Pepton, 12 g Fleisch	18	3,85	—	—	
	12. III.	170	2 g „ 12 g „	17	4,21	—	—	
	13. III.	167	0,05 g Phlorrhizin	6	2,04	—	—	
				bis 6h	nachmittags			
11	10. III.	223	7 g Pepton, 2 g Fleisch			+	—	
	11. III.	207	9 g „ 2 g „	12		+++	+	Am 15. III. ab und zu tobsüchtig
	12. III.	204	9 g „ 2 g „	10	0,24	+++	+	
	13. III.	202	9 g „ 2 g „	16	0,25	+++	+	
	14. III.	196	2 g „ 10 g „					
			0,05 g Phlorrhizin	15	3,44	+	—	Am 16. III. schwach
	15. III.	192	2 g Pepton, 12 g Fleisch	12	7,41	+	—	
	16. III.	184	2 g „ 12 g „	16	5,26	—	—	
	17. III.	178	0,05 g Phlorrhizin					
12	15. III.	199	8 g Pepton, 2 g Fleisch	4	+	+	—	
	16. III.	189	9 g „ 2 g „	9	+++	+++	+	
	17. III.	175	2 g „ 10 g „					
			0,05 g Phlorrhizin	12	5,33	++	—	
	18. III.	163	2 g Pepton 10 g Fleisch	15	6,75	+	—	Am 19. III. morgens Tier ganz schwach
	19. III.	158						

hydrate um 87,4 Proz., die Summe der Kohlehydrate um 96 Proz. abgenommen. Im Muskel haben Glykogen um 98,7 Proz., die übrigen Kohlehydrate um 46,6 Proz., in Summa die Kohlehydrate um 85,4 Proz. abgenommen. Der Blutzucker hat um 72 Proz. abgenommen. Aus diesen Daten geht hervor, daß, praktisch gesprochen, der Organismus als fast kohlehydratlos bezeichnet werden kann, wenn man die Leber und die Muskeln als die Hauptdepots der Kohlehydrate ansieht. Der Blutzucker war auf einen Wert gesunken, der gleich dem Hypoglykämiewert nach Insulin ist. Aus diesen Befunden geht hervor, daß die von mir verwandte Methode ihr Ziel erreicht, einen Zustand herbeizuführen, der in Hypoglykämie und äußerster Kohlehydratverarmung besteht. Aber das Symptomenbild ist ein anderes, als man es sieht, wenn Insulin injiziert worden ist. Ich komme später hierauf zu sprechen. Im starken Gegensatz zu allem bisher Geschilderten steht es mit dem Kohlehydratgehalt des Gehirns. Dasjenige, was ich als Glykogen bezeichne, hat in dieser Versuchsreihe sogar zugenommen, und zwar um 21,3 Proz., die übrigen Kohlehydrate haben um 35,4 Proz. abgenommen, es resultiert eine Abnahme der Summe von Kohlehydraten um nur 0,8 Proz. Dieses Resultat besagt, daß in einem Zustande experimentell herbeigeführter äußerster Kohlehydratverarmung des Organismus das Zentralnervensystem im wesentlichen seine Kohlehydratdepots festhält. Eine Anteilnahme der Kohlehydrate des Gehirns an dem abwärts gerichteten Stoffwechsel ist nicht erkennbar.

In der nächsten Versuchsreihe habe ich das Pepton weggelassen und von Anfang an die Tiere mit Schilddrüsenpräparaten und ausgekochtem Rindfleisch gefüttert. Als Schilddrüsenpräparat benutzte ich die Tabletten von Wellcomb, Bourrough & Cie., die Tablette zu 0,324 g Trockensubstanz. Das Tier kann täglich eine Tablette vertragen, vorausgesetzt, daß es reichlich mit Wasser versorgt wird. Außerdem habe ich, wie im vorherigen Versuch, Phlorrhizin injiziert. Die Tiere befanden sich in einem viel besseren Zustande, trotz der merklichen Gewichtsabnahme, weil sie nicht unter dem Einfluß von Pepton standen.

Die Ergebnisse und Einzelheiten dieser Versuchsreihe finden sich in Tabellen IV und IVa.

Im großen ganzen sind die Ergebnisse die gleichen wie im vorausgehenden Versuch. In der Leber haben das Glykogen um 95,6 Proz., die übrigen Kohlehydrate um 90,2 Proz., insgesamt die Kohlehydrate um 94,1 Proz. abgenommen. Im Muskel haben das Glykogen um 89 Proz., die übrigen Kohlehydrate um 71,4 Proz., die Summe der Kohlehydrate um 84,7 Proz. abgenommen. Die Abnahme des Blutzuckers beträgt 34,1 Proz., ist also etwas geringer als im vorigen Versuch. Im Gehirn haben das Glykogen um 24 Proz., die übrigen Kohlehydrate um 27,1 Proz., die Summe der Kohlehydrate um 25,3 Proz. abgenommen.

Tabelle IV.

Datum 1924	Nummer und Geschlecht des Tieres	Körpergewicht bei Beginn der Fütterung und unmittelbar vor der Tötung	Arten der Kohlehydrate	Kohlehydratgehalt mg pro g Gewebe: Leber	Muskel	Gehirn	Blutzuckergehalt mg pro ccm Blut	Gewicht der Leber und des Gehirns g	Bemerkungen
9. V.	15 ♂	166	Glykogen	1,05	0,46	0,50	0,85	5,2	Tier n. sehr geschwächt, stark abgemagert
		122	Übrige Kohlehydrate . . .	1,43	0,51	0,28		1,5	6 Schilddrüsenpräparat-tabletten
		(—44)	Summe der Kohlehydrate .	2,48	0,97	0,78			2 mal Phlorrhizin injiziert
3. VI.	21	164	Glykogen	0,98	0,84	0,63	0,81	5,0	8 Schilddrüsenpräparat-tabletten
		103	Übrige Kohlehydrate . . .	1,21	0,67	0,41		1,4	3 mal Phlorrhizin injiziert
		(—61)	Summe der Kohlehydrate .	2,19	1,51	1,04			
Durchschnitt . .		165	Glykogen	1,02	0,65	0,57	0,83	5,1	
		112,5	Übrige Kohlehydrate . . .	0,82	0,59	0,35		1,5	
		(—52,5)	Summe der Kohlehydrate .	1,84	1,24	0,92			

Wenn man diesen Durchschnitt mit dem normalen Tier vergleicht, ergibt sich folgende Tabelle:

Arten der Kohlehydrate	Abnahme: Leber mg	Leber Proz.	Muskel mg	Muskel Proz.	Gehirn mg	Gehirn Proz.	Blutzucker mg	Blutzucker Proz.
Glykogen	22,03	95,6	5,38	89,2	0,18	24,0	—	—
Übrige Kohlehydrate	7,57	90,2	1,47	71,4	0,13	27,1	0,42	34,1
Summe der Kohlehydrate . . .	29,60	94,1	6,85	84,7	0,31	25,3	0,42	34,1

Tabelle IV a.

Nr. des Tieres	Datum 1924	Körpergewicht g	Einverleibung des Präparats	Harn Menge ccm	Harn Reaktion	Harn Reduz. Substanz Proz.	Harn Eiweiß	Bemerkungen
15	1. V.	166	27 g Fleisch, 1 Schilddrüsentablette	2,8	schwach alkal.		—	
	2. V.	166	19 g Fleisch, 1 g Fett, 1 Schilddrüsentablette	4,3	„ „		—	
	3. V.	160	19 g „ 1 g „ 1 „	6,0	„ „		—	
	4. V.	156	21 g „ 1 g „ 1 „	5,6	„ „		—	Haare
	5. V.	153	21 g „ 1 g „ 0,05 g Phlorrhizin . . .	10	„ „	7,34	—	Appetitlos
	6. V.	142	Rest von gestern	14	„ „	7,69	—	
	7. V.	130	10 g Fleisch, 0,05 g Phlorrhizin, 1 Schilddrüsentablette	20	„ „	5,25	—	Etwas unwohl
	8. V.	129	21 g Fleisch, 0,05 g Phlorrhizin, 1 Schilddrüsentablette	31	„ „	4,74	—	
	9. V.	122						
21	22. VI.	164	25 g Fleisch, 1 g Fett, 1 Schilddrüsentablette	8	alkalisch		—	
	23. VI.	149	25 g „ 1 g „ 1 „	15	„		—	Dieses Tier zeigt keine Appetitlosigkeit
	24. VI.	148	25 g „ 1 g „ 1 „ 0,05 Phlorhizin	13	„	4,533		
	25. VI.	147	22 g Fleisch, 0,05 g Phlorrhizin, 1 Schilddrüsentablette	27	„	3,116		Vom 30. VI. polyphagisch
	26. VI.	138	22 g Fleisch, 0,05 g Phlorrhizin, 1 Schilddrüsentablette	22	„	0,325	+	
	27. VI.	128	20 g Fleisch, 0,05 g Phlorrhizin, 1 Schilddrüsentablette	28	„	1,882	—	
	28. VI.	118	20 g Fleisch, 1 g Fett, ohne Tablette	24	„	3,953	—	
	29. VI.	109	25 g „ 0,05 g Phlorrhizin, ohne Tablette	24	„	2,873	—	
	30. VI.	109	25 g „ 1 Schiddrüsentablette	34	„	0,954	—	
	31. VI.	105	25 g „ 1 „ 0,5 g Phlorrhizin	39	„	3,712	—	
	1. VII.	103	25 g Fleisch, ohne Schilddrüsentablette . . .	35	„	0,850	—	
	2. VII.	101	30 g „ „ „ . . .	26	„	0,798	—	
	3. VII.	103						

Wenn auch hier eine Abnahme zu konstatieren ist, so steht sie in gar keinem Vergleich zu der äußersten Kohlehydratverarmung des gesamten Organismus, und deshalb beweist auch dieser Versuch die Sonderstellung des Gehirns im Kohlehydratstoffwechsel.

In der nächsten Versuchsreihe ging ich im Aufbau der Methodik einen Schritt weiter, indem ich außer den bisherigen Maßnahmen zur Erzeugung der experimentellen Hypoglykämie und Kohlehydratverarmung des Organismus, nämlich der Zufuhr von Schilddrüsenpräparat und der Phlorrhizininjektion, noch die Muskeltätigkeit hinzufügte. Ich ließ die Ratten in einem eigens hierzu konstruierten Laufapparat, der keiner näheren Schilderung bedarf, bis zur vollständigen Ermüdung arbeiten. Ich habe die Tiere sofort nach der letzten Muskelarbeit behufs Analyse getötet.

In der letzten Zeit der Versuche zeigten die Tiere Polyphagie, eine Erscheinung, welche mir schon in der voraufgehenden Versuchsreihe aufgefallen war.

Das Ergebnis dieser Versuchsreihe an vier Tieren folgt in Tabelle V und Va.

Es ergibt sich, daß im Durchschnitt in der Leber Glykogen um 99 Proz., die übrigen Kohlehydrate um 93,8 Proz., die Summe der Kohlehydrate um 97,6 Proz. abgenommen haben. Im Muskel haben das Glykogen um 97,7 Proz., die übrigen Kohlehydrate um 48,5 Proz., die Summe der Kohlehydrate um 85,2 Proz. abgenommen. Der Blutzucker hat um 68,8 Proz. abgenommen. Auch in diesem Falle ist das Ziel erreicht worden, experimentell mit dieser neuen Methode das Tier praktisch kohlehydratfrei zu machen und Hypoglykämie von erheblichem Betrage zu erzeugen. Aber wiederum muß das Zentralnervensystem hiervon ausgeschlossen werden, indem im Gehirn das Glykogen um 22,7 Proz., die übrigen Kohlehydrate um 29,2 Proz., die Summe der Kohlehydrate um 25,3 Proz. abgenommen haben. Diese Abnahme ist unverhältnismäßig kleiner als diejenige in der Leber und im Muskel. Die Tiere befanden sich in einem Zustand, der nichts Auffallendes darbot.

In der nächsten Versuchsreihe habe ich die bisherigen Maßnahmen zur experimentellen Kohlehydratverarmung und Hypoglykämie noch dadurch erweitert, daß ich Strychnininjektionen gemacht habe. Den letzteren Eingriff wählte ich, um dadurch die Erregbarkeit des Zentralnervensystems zu erhöhen. Die Erscheinungen nach Strychnininjektionen sind bei der Ratte keine sehr ausgeprägten, man beobachtet nur eine etwas größere Unruhe der Tiere und leichte Krämpfe in der Gegend des Mundwinkels.

Die Ergebnisse und sonstigen Beobachtungen dieser Versuchsreihe finden sich in Tabelle VI und VIa.

Tabelle V.

Datum 1924	Nummer und Geschlecht des Tieres	Körpergewicht bei Beginn der Fütterung und unmittelbar vor der Tötung	Arten der Kohlehydrate	Kohlehydratgehalt mg pro g Gewebe			Blutzuckergehalt mg pro ccm Blut	Gewicht der Leber und des Gehirns g	Bemerkungen
				Leber	Muskel	Gehirn			
13. V.	14 ♀	178	Glykogen	0,13	0,27	0,48	0,47	6,3	7 Schilddrüsenpräparattabletten. 4 mal Phlorrhizin. 1 Std. 20 Min. Injektion im Arbeitsapparat.
		126	Übrige Kohlehydrate . . .	0,36	0,89	0,23		1,5	
		(—52)	Summe der Kohlehydrate .	0,49	1,16	0,71			
19. V.	16 ♂	181	Glykogen	0,16	Spur	0,66	0,38	5,3	7 Schilddrüsenpräparattabletten. 5 mal Phlorrhizininjekt. 2 Std. im Arbeitsapparat.
		125	Übrige Kohlehydrate . . .	0,35	1,31	0,37		1,6	
		(—56)	Summe der Kohlehydrate .	0,51	1,31	1,03			
22. V.	17 ♂	179	Glykogen	0,27	0,07	0,64	0,29	5,2	8 Schilddrüsenpräparattabletten. 5 mal Phlorrhizininjekt. 1 Std. 40 Min. im Arbeitsapparat.
		121	Übrige Kohlehydrate . . .	0,74	1,27	0,39		1,5	
		(—58)	Summe der Kohlehydrate .	1,01	1,34	1,03			
26. VI.	18 ♂	220	Glykogen	0,38	0,21	0,53	0,43	5,5	9 Schilddrüsenpräparattabletten. 3 mal Phlorrhizininjekt. 2 Std. 5 Min. im Arbeitsapparat.
		151	Übrige Kohlehydrate . . .	0,64	0,75	0,37		1,5	
		(—69)	Summe der Kohlehydrate .	1,02	0,96	0,90			
Durchschnitt . . .		1895	Glykogen	0,24	0,14	0,58	0,39	5,6	
		1308	Übrige Kohlehydrate . . .	0,52	1,06	0,34		1,5	
		(—587)	Summe der Kohlehydrate .	0,76	1,20	0,92			

Wenn man diesen Durchschnitt mit dem normalen Tier vergleicht, ergibt sich folgende Tabelle:

Arten der Kohlehydrate	Abnahme							
	Leber		Muskel		Gehirn		Blutzucker	
	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.
Glykogen	22,81	99,0	5,89	97,7	0,17	22,76	—	—
Übrige Kohlehydrate	7,87	93,8	1,00	48,5	0,14	29,2	0,86	68,8
Summe der Kohlehydrate . . .	30,68	97,6	6,89	85,2	0,31	25,3	0,86	68,8

Tabelle Va.

Nr. des Tieres	Datum 1924	Körpergewicht g	Einverleibung des Präparats	Harn: Menge ccm	Harn: Reaktion	Harn: Reduz. Substanz Proz.	Harn: Eiweiß	Bemerkungen
14	1. V.	178	29 g Fleisch, 1 g Fett	4,5	alkalisch		—	Am 4., 5. V. Tier unwohl.
	2. V.	176	22 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	3,2	"		—	Appetitlos.
	3. V.	171	Dasselbe	7	"		—	
	4. V.	166	24 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	3,4	"		—	
	5. V.	165	24 g Fleisch, 1 g Fett, ohne Tablette, 0,05 g Phlorrhizin	8,0	"	6,351	—	Vom 8. V. Appetit sehr gut, lebhaft.
	6. V.	159	Ohne Fleisch (Rest von gestern)	6,0	"	0,449	—	
	7. V.	154	15 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	13,0	"	5,526	—	
	8. V.	140	24 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	17,0	"	5,785	—	
	9. V.	138	24 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	15,0	"	9,879	—	
	10. V.	139	24 g Fleisch, 1 g Fett, ohne Tablette	6,2	"	0,648	—	
	11. V.	133	25 g Fleisch, 1 g Fett, ohne Tablette	6,5	sauer	0,528	—	
	12. V.	131	25 g Fleisch, 1 g Fett, ohne Tablette, 0,05 g Phlorrhizin	24,0	"	6,675	—	
	13. V.	126						
16	9. V.	181	25 g Fleisch, 1 g Fett	10	schwach sauer	0,708	—	
	10. V.	178	25 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	16	schwach alkal.	0,022	—	Am 11. V. Tier unwohl.
	11. V.	170	Dasselbe	18	"	0,062	—	Das Haar gesträubt.
	12. V.	165	25 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	25	"	4,168	—	
	13. V.	163	25 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	17	"	0,125	—	Vom 17. V. polyphagisch, lebhaft
	14. V.	159	25 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	34	alkalisch	7,142	+	
	15. V.	149	27 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	39	"	7,619	+	
	16. V.	149	27 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	35	"	3,846	+	
	17. V.	142	27 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	42	"	8,129	+	
	18. V.	124	Dasselbe	38	"	9,940	—	
	19. V.	125						

Tabelle Va. (Fortsetzung).

Nr. des Tieres	Datum 1924	Körpergewicht g	Einverleibung des Präparats	Harn Menge ccm	Harn Reaktion	Harn Reduz. Substanz Proz.	Harn Eiweiß	Bemerkungen
17	13. V.	179	24 g Fleisch, 1 g Fett	7,8	schwach sauer	0,021	—	
	14. V.	176	24 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	25	sauer	5,734	—	17. V. Appetit vermindert, unwohl.
	15. V.	167	27 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	13	schwach sauer	6,667	—	
	16. V.	160	25 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	24	schwach alkal.	1,818	+	
	17. V.	148	25 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	27	alkalisch	7,619	+	Vom 20. V. polyphagisch.
	18. V.	141	17 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	14	„	2,636	+	
	19. V.	140	27 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	38	„	4,908	+	
	20. V.	127	28 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	42	„	2,778	+	
	21. V.	123	28 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	35	„	6,400	+	
	22. V.	121						
18	16. VI.	220	25 g Fleisch, 1 g Fett, ohne Schilddrüsentablette	11	sauer		+	
	17. VI.	203	28 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	19	„		—	Vom 23. VI. polyphagisch.
	18. VI.	209	25 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	17	„		—	
	19. VI.	204	25 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	34	„	6,213	+	
	20. VI.	196	22 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	26	schwach sauer	2,385	+	
	21. VI.	186	22 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	31	„	4,251	+	
	22. VI.	177	25 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	30	„	3,593	+	
	28. V.	175	28 g Fleisch, 1 g Fett, ohne Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	34	schwach alkal.	7,264	+	
	24. VI.	167	28 g Fleisch, 1 g Fett, ohne Schilddrüsentablette	53	„	3,233	—	
	25. VI.	162	Dasselbe	25	alkalisch	0,898	—	
	25. VI.	151						

Tabelle VI.

Datum 1924	Nummer und Geschlecht des Tieres	Körpergewicht bei Beginn der Fütterung und unmittelbar vor der Tötung	Strychnininjektion, Menge, Zeit, Zeitdauer von Injektion bis Tötung	Arten der Kohlehydrate	Kohlehydratgehalt mg pro g Gewebe: Leber	Muskel	Gehirn	Blutzuckergehalt mg pro ccm Blut	Gewicht der Leber und des Gehirns g	Bemerkungen
28. V.	19 ♂	239 169 (—70)	0,05 mg um 10h 23' 0,05 mg um 11h, Tier empfindlich, am Mundwinkel Krampf 1h 42'	Glykogen	0,03	0,75	0,48	0,83	7,5 1,7	7 Schilddrüsentabletten, 4mal Phlorrhizininjektion, 1 Std. 20 Min. im Arbeitsapparat.
				Übrige Kohlehydrate .	0,32	0,82	0,25			
				Summe d. Kohlehydrate	0,35	0,95	0,74			
30. V.	20 ♀	203 141 (—61)	0,05 mg um 11h 45' 0,05 mg um 12h, Tier empfindlich, am Mundwinkel Krampf 1h 45'	Glykogen	0,03	0,06	0,35	0,82	6,4 1,6	10 Schilddrüsentabletten, 4mal Phlorrhizininjektion, 1 Std. 50 Min. im Arbeitsapparat.
				Übrige Kohlehydrate .	0,92	1,19	0,32			
				Summe d. Kohlehydrate	0,95	1,25	0,67			
Durchschnitt		221 155 (—66)		Glykogen	0,03	0,10	0,42	0,83	7,0 1,7	
				Übrige Kohlehydrate .	0,62	1,01	0,29			
				Summe d. Kohlehydrate	0,65	1,11	0,71			

Wenn man diesen Durchschnitt mit dem normalen Tier vergleicht, ergibt sich folgende Tabelle:

Arten der Kohlehydrate	Abnahme							
	Leber		Muskel		Gehirn		Blutzucker	
	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.
Glykogen	23,02	99,9	5,93	98,3	0,33	44,0	—	—
Übrige Kohlehydrate	7,77	92,6	1,05	51,0	0,19	39,6	0,42	34,1
Summe der Kohlehydrate . . .	30,79	97,9	6,98	86,3	0,52	42,3	0,42	34,1

Nr. des Tieres	Datum 1924	Körpergewicht g	Einverleibung des Präparates	Harn Menge	Harn Reaktion	Harn Reduz. Substanz Proz.	Harn Eiweiß	Bemerkungen
19	17. V.	239	25 g Fleisch, 1 g Fett	13	sauer	0,065	—	19. V. Appetit vermindert
	18. V.	238	27 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	14	„	0,059	—	
	19. V.	235	25 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	13	„	8,513	—	20. V. gar nichts gefressen
	20. V.	225	30 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	29	„	2,585	+	
	21. V.	214	27 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	19	„	8,889	+	23. V. Appetit gesteigert
	22. V.	198	20 g Fleisch, 1 g Fett, ohne Schilddrüsentablette	12	„	2,564	+	
	23. V.	188	20 g Fleisch, 1 g Fett, ohne Schilddrüsentablette, 0,02 g Phlorrhizin	28	„	3,137	+	25. V. polyphagisch
	24. V.	188	27 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	26	„	6,154	+	
	25. V.	182	38 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	46	„	2,871	+	
	26. V.	166	30 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	34	schwach sauer	4,908	—	
	27. V.	176	30 g Fleisch, 1 g Fett, ohne Schilddrüsentablette	38	„	2,250	—	
	28. V.	169						
20	19. V.	203	21 g Fleisch, 1 g Fett	17	schwach alkal.	0,037	—	
	20. V.	190	25 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	14	alkalisch	0,136	—	
	21. V.	182	27 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	29	„	6,154	—	
	22. V.	176	28 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	21	„	1,818	—	25. V. polyphagisch
	23. V.	175	Dasselbe	18	„	0,556	+	
	24. V.	176	28 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	37	„	6,557	+	
	25. V.	164	30 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	17	„	3,333	—	
	26. V.	166	30 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	36	„	4,348	—	
	27. V.	154	30 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	38	„	2,041	—	
	28. V.	154	30 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette, 0,05 g Phlorrhizin	37	„	5,333	—	
	29. V.	152	35 g Fleisch, 1 g Fett, eine Schilddrüsentablette	29	„	3,453	—	
	30. V.	151						

Die beiden Versuche haben folgendes durchschnittliches Ergebnis: In der Leber haben das Glykogen um 99,9 Proz., die übrigen Kohlehydrate um 92,6 Proz. und die Summe der Kohlehydrate um 97,9 Proz. abgenommen. Im Muskel haben das Glykogen um 98,3 Proz., die übrigen Kohlehydrate um 51 Proz., die Summe der Kohlehydrate um 86,3 Proz. abgenommen. Die Blutzuckerabnahme beträgt 34,1 Proz. Praktisch gesprochen, darf von einer angenäherten Kohlehydratfreiheit des Organismus gesprochen werden, nur daß die Abnahme des Blutzuckers nicht ganz so groß ist wie in den voraufgehenden Versuchsreihen. Was aber bemerkenswert ist im Gegensatz zu allen bisherigen Versuchsreihen, ist die Tatsache, daß diesmal im Gehirn die Verminderung des Kohlehydratbestandes sehr viel ausgesprochener geworden ist, denn es haben das Glykogen um 44 Proz., die übrigen Kohlehydrate um 39,6 Proz., die Summe der Kohlehydrate um 42,3 Proz. abgenommen. Es ist demnach der Kohlehydratbestand des Zentralnervensystems unter der neuen Bedingung dieser Versuchsreihe in den Stoffwechsel mit hineinbezogen worden. Der neue Eingriff war die Erregbarkeitssteigerung durch Strychnin. Am wichtigsten erscheint mir in dieser Versuchsreihe, daß sie wohl zum erstenmal am Säugetierorganismus die Anteilnahme der Kohlehydrate am Stoffwechsel des Zentralnervensystems aufdeckt.

In der nächsten Versuchsreihe habe ich die im übrigen normal ernährten Tiere mit Insulin injiziert. Als Insulinpräparat benutzte ich das vorzügliche der Firma Ely Lilly & Cie. Jedes Kubikzentimeter des von mir gebrauchten Präparats enthielt 10 Insulineinheiten. Die Ratte zeigt viel mehr Widerstand gegen Insulin als das Kaninchen, auch sind die Krämpfe durchaus nicht so typisch. Man sieht mehr Unruhe, Kraftlosigkeit und ganz leichte Krämpfe. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe findet sich in Tabelle VII.

Im Durchschnitt aus drei Versuchen haben in der Leber das Glykogen um 99,7 Proz., die übrigen Kohlehydrate um 98,7 Proz., die Summe der Kohlehydrate um 98,1 Proz. abgenommen. Im Muskel betragen die Abnahmen für Glykogen 92,6 Proz., die übrigen Kohlehydrate 53,9 Proz., für die Summe der Kohlehydrate 82,7 Proz. Der Blutzucker hat um 76,8 Proz. abgenommen. Verglichen mit meinen bisherigen Versuchsreihen, ergibt sich, daß die Kohlehydratverarmung des Organismus, gemessen an Leber und Muskel, die gleiche ist, woraus gefolgert werden darf, daß meine Maßnahmen das gleiche erzielen wie das Insulin. Was den Blutzucker anbetrifft, so ist allerdings die Abnahme nach Insulin noch erheblicher. Aber außerordentlich auffallend ist das Verhalten der Kohlehydrate im Zentralnervensystem, denn hier findet sich für das Glykogen eine *Zunahme* von 60 Proz., der allerdings eine Abnahme der übrigen Kohlehydrate um 72,9 Proz. entgegen-

Tabelle VII.

Datum 1924	Nummer und Geschlecht	Körpergewicht g	Insulin: Injektionszeit, Injektionsdosis, Erscheinungen nach der Injektion	Arten der Kohlehydrate	Kohlehydratgehalt mg pro g Gewebe: Leber	Muskel	Gehirn	Blutzuckergehalt mg pro ccm Blut	Gewicht der Leber und des Gehirns	Bemerkungen
6.III.	7 ♂	175	um 10h 10′ 0,5 ccm (5 Einheiten) um 10h 30′ 0,8 ccm (8 Einheiten) 10h 45′ schwach Bauchlage, 10h55′ tobsüchtig, 11h 05′ Krampf,	Glykogen	Spur	0,35	1,24	0,34	5,8	11h 10′ getötet
				Übrige Kohlehydrate .	0,41	1,01	0,10		1,6	
				Summe d. Kohlehydrate	0,41	1,36	1,34			
12.III.	9 ♀	134	um 11h 30′ 1 ccm (10 Einheiten) 11h 30′ etw. unruhig, schwach, 12h ganz kraftlos, 12h 30′ Krampf,	Glykogen	0,13	0,51	1,19	0,22	4,7	12h 40′ getötet
				Übrige Kohlehydrate .	0,63	0,98	0,20		1,6	
				Summe d. Kohlehydrate	0,76	1,49	1,39			
19.III.	13 ♂	155	um 1h 40′ 1,2 ccm (12 Einheiten) 2h 30′ unruhig, 4h schwach, kraftlos, 4h 10′ leichter Krampf	Glykogen	0,08	0,49	1,16	0,31	6,7	5h getötet
				Übrige Kohlehxdrate .	0,56	0,86	0,09		1,5	
				Summe d. Kohlehydrate	0,64	1,35	1,25			
Durchschnitt		155		Glykogen	0,07	0,45	1,20	0,29	5,7	
				Übrige Kohlehydrate .	0,53	0,95	0,13		1,6	
				Summe d. Kohlehydrate	0,60	1,40	1,33			

Wenn man diesen Durchschnitt mit dem normalen Tier vergleicht, ergibt sich folgende Tabelle:

Arten der Kohlehydrate	Abnahme: Leber mg	Leber Proz.	Muskel mg	Muskel Proz.	Gehirn mg	Gehirn Proz.	Blutzucker mg	Blutzucker Proz.
Glykogen	22,98	99,7	5,58	92,6	0,45	60,0+	—	—
Übrige Kohlehydrate	7,86	93,7	1,11	53,9	0,35	72,9	0,96	76,8
Summe der Kohlehydrate . .	30,84	98,1	6,69	82,7	0,10	8,1+	0,96	76,8

steht. Die Summe der Kohlehydrate zeigt eine Zunahme von 8,1 Proz. Diese Zahlen erwecken fast den Eindruck, daß unter der Einwirkung des Insulins das Zentralnervensystem Kohlehydrate an sich reißt, eine Annahme, welche bekanntlich in der Insulinliteratur vertreten wird. Ich will auf diese schwierige Frage an dieser Stelle nicht eingehen, aber eins muß doch hervorgehoben werden, nämlich, daß keinesfalls Insulin als solches unmittelbar das Zentralnervensystem um seine Kohlehydrate bringt, wie das bei der Leber und dem Muskel der normalen Ratte der Fall ist. Die Tatsache, daß Insulin Krämpfe hervorruft, könnte die Vermutung entstehen lassen, daß an der Genese dieser Krämpfe eine Kohlehydratverarmung des Zentralnervensystems Anteil hätte. Meine soeben mitgeteilten Versuche verleihen einer solchen Annahme keinerlei Stütze.

Meine nachfolgenden Versuche wurden an Kaninchen angestellt, die ich deshalb zum Versuch heranziehen mußte, weil bei dem Kaninchen die Krämpfe nach Insulininjektion, ganz anders als bei der Ratte, das markanteste im Bilde dieser Form der experimentellen Hypoglykämie sind. Hier war demnach die Gelegenheit gegeben, die Beziehungen zu prüfen, welche etwa zwischen Insulinhypoglykämie, Krämpfen und dem Kohlehydratstoffwechsel des Zentralnervensystems beständen, eine Frage, die bisher überhaupt noch nicht in Angriff genommen worden ist.

Die analytischen Methoden waren die gleichen wie in der früheren Versuchsreihe. Ich habe zudem noch den Kohlehydratgehalt des Herzens bestimmt, und zwar deshalb, weil vom Herzen schon bekannt ist, daß dasselbe seinen Glykogenbestand viel fester hält als die Leber und die Skelettmuskeln.

Die von mir beobachteten Symptome nach der Insulininjektion des Kaninchens sind die nachfolgenden: Zuerst wird das Ohr infolge Gefäßverengerungen blaß; zweitens wird die Atmung tiefer, drittens wird das Tier unruhig, viertens treten Zuckungen der Extremitäten auf, fünftens wird das Ohr hyperämisch, sechstens treten Krämpfe auf, zeitweise wiederholte typische Rollbewegungen, siebentens erfolgt ergiebiger Speichelfluß. In der ersten Versuchsreihe habe ich die Tiere erst nach mehrmaligen Krämpfen getötet.

Zunächst bringe ich die Tabelle VIII, die Ergebnisse meiner Untersuchung des Kohlehydratgehalts normaler Kaninchen.

Die durchschnittlichen Werte aus drei Versuchen sind die nachfolgenden: Pro 1 g Gewebe in der Leber 33,46 mg Glykogen, 4,70 mg übrige Kohlehydrate, 38,16 mg Summe der Kohlehydrate; im Muskel 6,45 mg Glykogen, 2,41 mg übrige Kohlehydrate, 8,86 mg Summe der Kohlehydrate, im Herzen 2,04 mg Glykogen, 0,38 mg übrige Kohlehydrate, 2,42 mg Summe der Kohlehydrate, im Gehirn 0,39 mg Gly-

Tabelle VIII.

Datum 1924	Nummer und Geschlecht	Körpergewicht g	Arten der Kohlehydrate	Kohlehydratgehalt mg pro g Gewebe				Blutzuckergehalt mg pro ccm Blut	Gewicht der Leber, des Gehirns und des Herzens g	Bemerkungen
				Leber	Muskel	Herz	Gehirn			
2. VI.	1 ♂	544	Glykogen	23,71	4,48	1,86	0,41	1,06	27,3	Mit Brot, Milch und wenig Gemüse gefüttert
			Übrige Kohlehydrate . . .	5,25	3,54	0,41	0,43		6,8	
			Summe der Kohlehydrate .	28,96	8,02	2,27	0,84		1,8	
4. VI.	2 ♀	567	Glykogen	48,55	8,63	2,70	0,33	1,32	37,6	Ebenso
			Übrige Kohlehydrate . . .	3,48	2,06	0,29	0,37		6,8	
			Summe der Kohlehydrate .	52,03	10,69	2,99	0,70		1,6	
10. VI.	3 ♂	595	Glykogen	28,13	6,23	1,57	0,42	1,24	28,2	Ebenso
			Übrige Kohlehydrate . . .	5,38	1,64	0,43	0,39		5,4	
			Summe der Kohlehydrate .	33,51	7,87	2,00	0,81		1,9	
Durchschnitt . .		568,9	Glykogen	33,46	6,45	2,04	0,39	1,21	31,0	Ebenso
			Übrige Kohlehydrate . . .	4,70	2,41	0,38	0,40		6,3	
			Summe der Kohlehydrate .	38,16	8,86	2,42	0,79		1,8	

Die Kaninchen wurden alle gleich gefüttert.

kogen, 0,40 mg übrige Kohlehydrate, 0,79 mg Summe der Kohlehydrate. Blutzuckergehalt 1,21 mg pro 1 ccm Blut.

Hierauf wurde eine Versuchsreihe angestellt, in welcher bei drei Kaninchen Insulininjektionen ausgeführt und die Tiere erst getötet wurden, nachdem mehrfach Krämpfe aufgetreten waren.

Das Ergebnis dieser Versuche findet sich in Tabelle IX.

Der Durchschnitt aus den Werten der drei Versuche ergibt folgendes: In der Leber haben das Glykogen um 74,8 Proz., die übrigen Kohlehydrate um 72,8 Proz., die Summe der Kohlehydrate um 74,5 Proz. abgenommen. Im Muskel beträgt die Abnahme für Glykogen 76,6 Proz., für die übrigen Kohlehydrate 56,4 Proz. und für die Summe der Kohlehydrate 85,7 Proz. Im Herzen findet sich eine Abnahme des Glykogens um 11,8 Proz., wo hingegen die übrigen Kohlehydrate um 52 Proz. zugenommen haben. Der Blutzucker hat um 81 Proz. abgenommen. Was das Gehirn anbelangt, so hat das Glykogen um 82 Proz. abgenommen, die übrigen Kohlehydrate um 45 Proz., für die Summe der Kohlehydrate um 63,3 Proz. Aus diesen Versuchsergebnissen ist zunächst bemerkenswert, daß diesmal die Abnahme der Kohlehydrate in den Muskeln größer ist als in der Leber. Dies dürfte in erster Linie den heftigen Krämpfen, in zweiter Linie dem Umstande zuzuschreiben sein, daß die Versuche kurzdauernd waren und ein die Leberdepots entleerender Eingriff nicht voraufgeht. Die Abnahme der Kohlehydrate im Herzen war, wie zu erwarten stand, eine kaum merkliche, ja die freien Kohlehydrate hatten sogar zugenommen. Bei weitem das interessanteste Ergebnis ist aber die große Abnahme der Kohlehydrate des Gehirns, es ist die größte gewesen unter allen Versuchen, von denen ich bisher berichten konnte. Unzweifelhaft haben sich in diesem Falle die Kohlehydrate an dem Stoffwechsel des Gehirns im Sinne des Verbrauchs beteiligt. Es erhebt sich sofort die Frage, ob dies eine spezifische Folge des Insulins und die ausgeprägten Krämpfe etwa eine Folgeerscheinung des Kohlehydratmangels des Gehirns sei oder ob umgekehrt die intensiven Krämpfe, welche beim Kaninchen auftreten, auch die Kohlehydrate des Gehirns in Mitleidenschaft ziehen. Hierbei wird daran gedacht, ob nicht die krampferregende Ursache zum Teil im Gehirn gelegen sei. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu entscheiden, habe ich die beiden nachfolgenden Versuchsreihen angestellt, wovon die eine in Insulininjektionen ohne Krampferzeugung bestand, während in der anderen Versuchsreihe das zentrale Krampfgift Pikrotoxin verwendet wurde.

Die beiden Versuchsreihen führten zu einer Beantwortung der aufgeworfenen Frage.

Die in Tabelle X ermittelten Daten ergeben, daß durchschnittlich in der Leber das Glykogen um 52,2 Proz., die übrigen Kohlehydrate

Tabelle IX.

Datum 1924	Nr. und Geschlecht	Körpergewicht g	Insulin-Injektionsmenge, Injektionszeit, Zeitdauer von Injektion bis Tötung	Arten der Kohlehydrate	Kohlehydratgehalt mg pro g Gewebe: Leber	Muskel	Herz	Gehirn	Blutzuckergehalt mg pro ccm Blut	Gewicht der Leber, des Herzens u. des Gehirns g	Bemerkungen
16. VI.	4 ♀	995	1,0 ccm (10 Einheiten) 10h vorm. 2 Std. 55 Min.	Glykogen	7,85	0,45	1,65	0,05	0,26	39,5	10h15′ Ohr anämisch 11 30 Ohr hyperämisch 12 10 1. Krampf, Speichelfl. 12 25 2. „ (Rollbew.) 12 40 3. „ kraftlos
				Übrige Kohlehydrate	1,94	1,26	0,78	0,29		2,5	
				Summe d. Kohlehydrate	9,79	1,71	2,43	0,34		7,7	
18. VI.	5 ♂	1550	1,5 ccm (15 Einheiten) 9h 40′ vorm. 2 Std. 15 Min.	Glykogen	13,49	0,11	1,53	0,04	0,25	63,5	10 00 Ohr anämisch 11 00 furchtbar unruhig, Ohr hyperämisch 11 30 leichter Krampf 11 32 tobsüchtig, Krampf, Speichelfluß (Rollbewegung 11 40 Bauchlage, heftiger Krampf (Rollbew.)
				Übrige Kohlehydrate	0,69	1,13	0,44	0,17		3,8	
				Summe d. Kohlehydrate	14,18	1,24	1,97	0,21		7,1	
20. VI.	6 ♂	1010	1,0 ccm (10 Einheiten) 10h vorm. 2 Std. 30 Min.	Glykogen	4,01	0,09	2,21	0,11	0,19	36,5	10 20 anämisch 10 45 stark hyperäm. 11 45 Krampfanfall 2 mal 12 00 heftige Rollbew., Speichelfluß 12 07 —12h 20′ ab und zu Krampf 12 23 Krampf
				Übrige Kohlehydrate	1,22	0,76	0,41	0,19		2,5	
				Summe d. Kohlehydrate	5,23	0,85	2,62	0,30		7,6	
Durchschnitt		1185		Glykogen	8,45	0,22	1,80	0,07	0,23	46,5	
				Übrige Kohlehydrate	1,28	1,05	0,54	0,22		2,9	
				Summe d. Kohlehydrate	9,73	1,27	2,34	0,29		7,5	

Wenn man diesen Durchschnitt mit dem normalen Tier vergleicht, ergibt sich folgende Tabelle:

Arten der Kohlehydrate	Abnahme: Leber mg	Leber Proz.	Muskel mg	Muskel Proz.	Herz mg	Herz Proz.	Gehirn mg	Gehirn Proz.	Blutzucker mg	Blutzucker Proz.
Glykogen	25,01	74,8	6,23	96,6	0,24	11,8	0,32	82,1	—	—
Übrige Kohlehydrate	3,42	72,8	1,36	56,4	0,16	42,1	0,18	45,0	0,98	81,0
Summe der Kohlehydrate	28,43	74,5	7,59	85,7	0,08	3,3	0,50	63,3	0,98	81,0

Tabelle X.

Datum 1924	Nummer und Geschlecht	Körpergewicht g	Insulin-Injektionsdosis, Injektionszeit, Zeitdauer von Injektion bis Tötung	Arten der Kohlehydrate	Kohlehydratgehalt mg pro g Gewebe: Leber	Muskel	Herz	Gehirn	Blutzuckergehalt mg pro ccm Blut	Gewicht der Leber, des Herzens und des Gehirns	Bemerkungen
11. VII.	10 ♂	1430	1,4 ccm	Glykogen	14,19	4,81	1,83	0,35	0,33	62,0	10h30′ Ohr anämisch
			(14 Einheiten)	Übrige Kohlehydrate	1,75	1,29	0,96	0,44		2,6	
			9h 50′ vorm.							7,7	
			1 Std. 50 Min.	Summe d. Kohlehydrate	15,94	6,10	2,79	0,79			
14. VII.	11 ♂	1370	1,2 ccm	Glykogen	17,82	3,56	2,01	0,58	0,62	61,0	10h15′ Ohr anämisch
			(12 Einheiten)	Übrige Kohlehydrate	3,29	1,85	0,45	0,41		2,8	
			10h 07′ vorm.							8,2	
			1 Std. 3 Min.	Summe d. Kohlehydrate	21,11	5,41	2,46	0,99			
Durchschnitt				Glykogen	16,01	4,19	1,92	0,47	0,48	61,5	
				Übrige Kohlehydrate	3,02	1,57	0,71	0,48		2,7	
				Summe d. Kohlehydrate	19,03	5,76	2,63	0,95		7,95	

Wenn man diesen Durchschnitt mit dem normalen Tiere vergleicht, ergibt sich folgende Tabelle:

Arten der Kohlehydrate	Abnahme: Leber mg	Leber Proz.	Muskel mg	Muskel Proz.	Herz mg	Herz Proz.	Gehirn mg	Gehirn Proz.	Blutzucker mg	Blutzucker Proz.
Glykogen	17,45	52,2	2,26	35,0	0,12	5,9	0,08+	20,5	—	—
Übrige Kohlehydrate	1,68	35,7	0,84	34,9	0,33+	86,8	0,08+	20,0	0,73	60,3
Summe der Kohlehydrate	19,13	50,1	3,10	35,0	0,21+	8,7	0,16+	20,3	0,73	60,3

um 35,7 Proz., die Summe der Kohlehydrate um 50,1 Proz. abgenommen haben. Im Muskel das Glykogen um 35 Proz., die übrigen Kohlehydrate um 34,9 Proz., die Summe der Kohlehydrate um 35 Proz., im Herzen das Glykogen um 5,9 Proz., die übrigen Kohlehydrate aber um 86,8 Proz. *zugenommen* haben, insgesamt die Kohlehydrate um 8,7 Proz. zugenommen haben. Der Blutzucker hat um 60,3 Proz. abgenommen. Überblickt man diese Ergebnisse, so zeigt sich nach Insulininjektion ohne Krämpfe eine sehr ausgesprochene Hypoglykämie, eine hochgradige Abnahme der Kohlehydrate in Leber und Muskel, hingegen im Herzen eine recht beträchtliche Zunahme der übrigen Kohlehydrate. Noch bemerkenswerter ist aber das Verhalten der Kohlehydrate im Gehirn. Sämtliche Kohlehydratarten zeigen eine durchschnittliche Zunahme von rund 20 Proz. Diesem Verhalten sind wir schon bei den Versuchen bei der Ratte begegnet, während in dem voraufgehenden Versuch, wo am Kaninchen nach Insulininjektion heftige Krämpfe auftraten, auch die Kohlehydratbestände des Gehirns stark in Mitleidenschaft gezogen worden waren. Bei der Ratte nun, wo nur höchst abortive Krämpfe zum Vorschein kamen, und bei diesem Insulinversuch, wo die Krämpfe ausblieben, ist keine Rede von einer Abnahme der Kohlehydrate des Gehirns. Wenn, wie in Versuch 9, die Abnahme nach Insulininjektion eine sehr große ist, muß das an den Krämpfen liegen. Dies geht nun mit aller Deutlichkeit aus den nachfolgenden Versuchen der Tabelle XI hervor. In diesem Versuch habe ich drei Tieren Pikrotoxin injiziert. Die Pikrotoxininjektion führt bei den Kaninchen zu nachfolgenden Symptomen: Unruhe, Flacherwerden der Atmung und Beschleunigung derselben, Zuckungen der Extremitäten, heftige Krämpfe mit Opistotonus, aber niemals wie nach Insulin Rollbewegungen, Speichelfluß und Verengerung der Pupille.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe an drei Kaninchen folgen in Tabelle XI.

Aus dieser Versuchsreihe geht hervor, daß die durchschnittliche Abnahme in der Leber an Glykogen 58,6 Proz., an den übrigen Kohlehydraten 44,9 Proz., an der Summe der Kohlehydrate 56,9 Proz. beträgt. Im Muskel haben das Glykogen um 93,8 Proz., die übrigen Kohlehydrate um 56 Proz., die Summe der Kohlehydrate um 83,5 Proz. abgenommen. Es zeigt sich hier wiederum, daß bei Krampfzuständen die Kohlehydratbestände des Muskels eine weit größere Abnahme aufweisen als diejenige der Leber, wenn letztere nicht einer spezifischen Vorbehandlung unterzogen wird. Im Herzen hat das Glykogen nur um 1,7 Proz. abgenommen, während die übrigen Kohlehydrate um 65,8 Proz. zugenommen haben, so daß die Summe der Kohlehydrate um 9,1 Proz. zugenommen hat. Es liegen hier Verhältnisse am Herzen vor, die durch

Tabelle XI.

Datum 1924	Nummer und Geschlecht	Körpergewicht g	Pikrotoxin-Injektionsdosis, Injektionszeit, Zeitdauer von Injektion bis Tötung	Arten der Kohlehydrate	Kohlehydratgehalt mg pro g Gewebe: Leber	Muskel	Herz	Gehirn	Blutzuckergehalt mg pro ccm Blut	Gewicht der Leber, des Herzens und des Gehirns	Bemerkungen
4.VII.	7 ♂	920	0,5 mg 9h 15'	Glykogen	10,69	1,04	1,58	0,27	3,08	38,2	9h 30' unruhig
										2,5	9 50 Zuckung d. Extremität.
			0,5 mg 9h 45'	Übrige Kohlehydrate . .	3,13	1,25	0,35	0,08		7,7	10 15 heft. Krampf, Speichelfluß, Pupille verengert, dann schwach
			1 Std. 20 Min.	Summe d. Kohlehydrate	13,82	2,29	1,93	0,35			10 35 getötet
7.VII.	8 ♀	980	1,0 mg 9h 45' vorm.	Glykogen	16,52	0,09	1,94	0,06	2,61	58,5	10h 15' unruhig
				Übrige Kohlehydrate . .	2,21	0,85	0,42	0,41		2,2	10 30 heftiger Krampf, Opistotonus
			50 Min.	Summe d. Kohlehydrate	18,73	0,94	2,36	0,47		8,3	10 35 getötet
9.VII.	9	1050	0,8 mg 10h 15'	Glykogen	14,31	0,07	2,51	0,06	2,33	48,0	12h 20' leichter Krampf
										2,2	12 40 Speichelfluß, Krampf
			0,5 mg 12h 15' 0,4 mg 12h 45' vm.	Übrige Kohlehydrate . .	2,42	1,07	1,11	0,38		7,3	12 50 Pupille verengert, ab und zu Krampf
			2 Std. 50 Min.	Summe d. Kohlehydrate	16,73	1,14	3,62	0,44			1 00 heftiger Krampf, Opistotonus
Durchschnitt		983		Glykogen	13,84	0,40	2,01	0,13	2,67	48,3	
				Übrige Kohlehydrate . .	2,59	1,06	0,63	0,29		2,3	
				Summe d. Kohlehydrate	16,43	1,46	2,64	0,42		7,8	

Wenn man diesen Durchschnitt mit dem normalen Tiere vergleicht, ergibt sich folgende Tabelle:

Arten der Kohlehydrate	Abnahme: Leber mg	Leber Proz.	Muskel mg	Muskel Proz.	Herz mg	Herz Proz.	Gehirn mg	Gehirn Proz.	Blutzucker mg	Blutzucker Proz.
Glykogen	19,62	58,6	6,05	93,8	0,03	1,7	0,26	66,7	—	—
Übrige Kohlehydrate	2,11	44,9	1,35	56,0	0,25+	65,8	0,11	27,5	1,46+	12,6
Summe der Kohlehydrate . .	21,73	56,9	7,40	83,5	0,22+	9,1	0,37	46,8	1,46+	12,6

anderweitige Versuche schon erkannt worden sind. Der Blutzuckergehalt hat ganz im Gegensatz zu allen anderen Versuchsreihen, die ich mitgeteilt habe, um den hohen Betrag von 120,6 Proz. zugenommen. Diese große Zunahme infolge der Krampfzustände läßt sich aus der Mitwirkung verschiedener Momente erklären, nämlich der Ausschüttung von Glykogen aus der Leber infolge von nervösen Erregungen, welche dieselbe betreffen, sowie der Dyspnoe, ferner durch die Ausschüttung von Adrenalin durch die Erregungen, welche die Nebenniere auf dem Wege des Splanchnicus erreichen. Der Hauptnachdruck ist auf das Verhalten der Kohlehydrate des Gehirns zu legen. Hier sehen wir, daß das Glykogen um 66,7 Proz. abgenommen hat, die übrigen Kohlehydrate um 27,5 Proz., die Summe der Kohlehydrate um 46,8 Proz. Es kann auf Grund dieses Versuchsergebnisses kein Zweifel bestehen, daß die Erregungszustände, welche das am Zentralnervensystem angreifende Pikrotoxin herbeigeführt hat, die Beteiligung der Kohlehydrate des Gehirns am Stoffwechsel erzwangen. Somit glaube ich den Nachweis erbracht zu haben, daß, während bei sonstigen experimentellen Hypoglykämien und Kohlehydratverarmungen des Organismus das Gehirn sich nur in einem sehr mäßigen Umfange betroffen erweist, bei zentral erregten Krämpfen im Gehirn Umsetzungen der Kohlehydrate stattfinden, und zwar in einem größeren Umfange als beim Herzen, welches viel zäher seine Kohlehydrate festhält.

In allen voraufgehenden Versuchen habe ich vom Glykogengehalt des Gehirns gesprochen. Streng genommen bedeutet dieser Ausdruck aber nichts anderes, als daß man den Zucker, den man nach Invertierung erhält, wenn man *Pflügers* Methode der Glykogenbestimmung benutzt hat, als Glykogen verrechnet. Dies ist aber nur zulässig, wenn Gewähr dafür vorliegt, daß dieser Zucker ausschließlich aus Glykogen entstanden ist. Gewisse Beobachtungen während meiner Versuche ließen einige Zweifel darüber aufkommen, ob Glykogen vorläge, denn es zeigten sich Unterschiede in der Löslichkeit, und die Glykogenreaktion mit Jod war weniger leicht zu erhalten. Auch mußte daran gedacht werden, ob nicht aus dem Cerebron des Gehirns durch die Prozeduren bei der *Pflüger*schen Methode Galaktose abgespalten werde und hieraus der analytisch gefundene Zuckerwert stamme. Aus diesem Grunde habe ich versucht, Gehirne, ehe sie der *Pflüger*schen Methode der Glykogenbestimmung unterzogen wurden, mit Acetonäther und absolutem Alkohol zu extrahieren. Diese Methode führte aber nicht zu einem befriedigenden Ergebnis. Ich wandte mich daher der neuen, von *Rona* und *Eweyk*[1]) beschriebenen Methode der Glykogendarstellung zu, die gerade veröffentlicht wurde, als ich meine Arbeit zum Abschluß brachte.

[1]) *Rona* und *Eweyk*, diese Zeitschr. **149**, 174, 1924.

Ich schildere in Kürze die Methode, wie ich sie am Gehirn sowie an der Leber zur Kontrolle angestellt habe. Nach Abspülung des Gewebes mit kaltem Leitungswasser wurde es in etwa bohnengroße Stücke zerschnitten und in eine Eis-Kochsalzkältemischung gebracht, bis die Stücke fest gefroren waren. Sie wurden im Mörser unter Zusatz von Quarzsand fein zerrieben. Sodann wurde der Gewebsquarzsand mit 3proz. Trichloressigsäure gut verrührt und nach Zusatz von reichlichem destillierten Wasser abgenutscht. Der Rückstand wurde noch zweimal mit destilliertem Wasser verrieben und filtriert. Die Filtrate wurden durch Kalilauge auf etwa 5 Proz. alkalisch gemacht. Die weißlich trübe Flüssigkeit wird erneut filtriert. Das Filtrat wird mit dem zweimaligen Volumen 95proz. Alkohols versetzt und über Nacht sich selbst überlassen. Während dieser Zeit setzt sich ein fein flockiger Niederschlag zu Boden, während am Glas keine Niederschläge zu bemerken sind. Der Niederschlag wird nach *Pflügers* Methode mit 60-, 95proz. und absolutem Alkohol sowie mit Äther gewaschen und im übrigen nach *Pflüger* invertiert.

Zunächst habe ich zur Prüfung des quantitativen Wertes der neuen Methode sie an der Leber angewandt und gleichzeitig Teile des nämlichen Leberbreies mit der *Pflüger*schen Methode untersucht.

Das Ergebnis dieser Versuchsreihe findet sich in Tabelle XII.

Tabelle XII.

Datum	Versuchsnummer	Arten der Kohlehydrate	Kohlehydratgehalt in der Leber mg pro g Leber	
			nach *Pflüger*scher Methode	nach neuer Methode
14. VII.	1	Glykogen	17,82	19,23
		Übrige Kohlehydrate .	4,29	
		Summe d. Kohlehydrate	22,11	
17. VII.	2	Glykogen	23,81	24,39
		Übrige Kohlehydrate .	1,74	
		Summe d. Kohlehydrate	25,55	
22. VII.	3	Glykogen	37,66	38,46
		Übrige Kohlehydrate .	1,07	1,83
		Summe d. Kohlehydrate	39,73	40,29
24. VII.	4	Glykogen	36,70	37,35
		Übrige Kohlehydrate .	4,54	3,57
		Summe d. Kohlehydrate	41,24	40,92

Aus den vier Versuchen folgt, daß beide Methoden an der Leber die gleichen Werte für Glykogen ergeben, so daß sie quantitativ analytisch an diesem Gewebe gleich gut brauchbar sind. Sodann schritt ich dazu, die Methode gleichzeitig an der Leber und an dem Gehirn des Kaninchens anzuwenden.

Das Resultat dieser Versuche findet sich in Tabelle XIII.

Tabelle XIII.

Datum 1924	Versuchs-nummer	Körpergewicht d. Tieres g	Arten der Kohlehydrate	Kohlehydratgehalt mg pro g Gewebe		Gewicht der Leber und des Gehirns g
				Leber	Gehirn	
14. VII.	1	1370	Glykogen	19,23	fehlt	61,0
			Übrige Kohlehydrate .	fehlt	„	8,2
			Summe d. Kohlehydrate	fehlt	fehlt	
17. VII.	2	160	Glykogen	24,39	0,11	1,01 *)
			Übrige Kohlehydrate .	fehlt	fehlt	1,1
			Summe d. Kohlehydrate	fehlt	fehlt	
22. VII.	3	1700	Glykogen	38,46	0,13	
			Übrige Kohlehydrate .	1,83	0,43	
			Summe d. Kohlehydrate	40,29	0,56	
24. VII.	4	168	Glykogen	28,35	0,13	
			Übrige Kohlehydrate .	3,57	0,46	
			Summe d. Kohlehydrate	31,92	0,59	

*) Blutzucker 1,09 mg in 1 ccm.

Es bedarf keiner Bemerkungen über die Ergebnisse an der Leber. In diesen vier Versuchen ergibt sich durchschnittlich das gleiche wie in meinen früheren Versuchen. Hingegen wurden im Gehirn niedrigere Werte für das Glykogen erhalten als früher, nämlich in einem Versuch 0,11 mg, in einem zweiten Versuch 0,13 mg, ebenso in einem dritten Versuch pro 1 g Gehirn. In einem Versuch mißlang der Nachweis von Glykogen. Nimmt man das Mittel aus den drei positiven Versuchen, so würde sich ergeben, daß nur ein Drittel der früher als Glykogen bezeichneten Stoffmenge wirklich als Glykogen zu bezeichnen ist.

In einer nachfolgenden Arbeit, deren Veröffentlichung bald erfolgen wird, habe ich mich mit weiteren Versuchen beschäftigt, um die aus dem Gehirn erhaltbare Substanz als Glykogen zu identifizieren. Vorläufig teile ich hier mit, daß es mir gelungen ist, an einigen höchst gereinigten Präparaten die Glykogenreaktion anzustellen. Vorbehaltlich späterer Entscheidung darf aber jedenfalls — und das ist wohl das Wesentliche — als gesichert bezeichnet werden, daß im Zentralnervensystem eine gebundene Form der Kohlehydrate vorkommt, welche Eingriffen gegenüber zur Kohlehydratverarmung im Gegensatz zu Leber und Muskeln wie auch dem Blute sich als sehr widerstandsfähig erweist, hingegen bei Anwendung von zentralerregenden Krampfgiften erheblich abnimmt. Dasjenige, was hierbei am wesentlichsten erscheint, ist der Nachweis eines eigenen Kohlehydratstoffwechsels des Zentralnervensystems, und zwar eines autonomen Stoffwechsels.

Zusammengefaßt, sind die Ergebnisse meiner Arbeit die folgenden:

1. Es wurde in Fortführung von früheren Arbeiten des Berner physiologischen Instituts eine Methode ausgearbeitet, um bei Tieren — zunächst Ratten — eine äußerste experimentelle Kohlehydratverarmung und Hypoglykämie zu erzeugen. Die Methode besteht in der Fütterung von Pepton, dann Schilddrüsenpräparaten, Phlorrhizininjektionen und eventuell Muskeltätigkeit.

2. Es gelingt mit dieser Methode, Leber und Muskel praktisch fast kohlehydratlos zu machen, sowie Hypoglykämie von der Größenordnung wie nach Insulin herbeizuführen.

3. Das Bild nach dieser Form von experimenteller Kohlehydratverarmung und Hypoglykämie ist anders wie das Bild der Insulinhypoglykämie.

4. Es wurden die Kohlehydratbestände des Zentralnervensystems untersucht und auf Grund der analytischen Methoden als Glykogen und als übrige Kohlehydrate verrechnet. Es ergab sich im Gehirn ein zwar kleiner, aber doch bestimmter Gehalt an diesen beiden Stoffen.

5. Bei der nach obiger Methode herbeigeführten Kohlehydratverarmung und Hypoglykämie erwies sich der Kohlehydratbestand des Gehirns als sehr resistent. Die Abnahmen waren unvergleichlich kleiner als diejenigen in Leber, Muskel und Blut.

6. An Ratten bewirkte Insulin die gleiche Kohlehydratverarmung von Leber und Muskeln und vom Blute wie nach der obigen neuen Methode, die Änderung des Kohlehydratbestandes des Gehirns aber richtete sich nach dem durch Insulin herbeigeführten Zustand der Tiere.

7. Vorsichtige Strychnininjektion an der Ratte bewirkte eine viel größere Abnahme der Kohlehydrate des Gehirns als die anderen Maßnahmen; dies sprach dafür, daß die Abnahme der Kohlehydrate des Gehirns nach Insulin von den begleitenden Erregungszuständen im Gehirn abhängt.

8. Diese Auffassung wurde durch Untersuchungen am Kaninchen bestätigt. Auch im Gehirn des Kaninchens wurden Glykogen — identifiziert durch die Jodreaktion an einem eigens dazu hergestellten reinen Präparat — und die übrigen Kohlehydrate quantitativ bestimmt. Insulininjektionen bewirkten beim Kaninchen nur dann sehr große Abnahmen des Kohlehydratbestandes des Gehirns, wenn sie von heftigen Krämpfen gefolgt waren.

9. Die Kohlehydrate der Herzen von Kaninchen erwiesen sich als noch resistenter als die Kohlehydrate des Gehirns, indem sie nicht allein nicht abnahmen, sondern teilweise sogar erheblich zunahmen, eine für das Verständnis der Insulinwirkung beachtenswerte Erscheinung.

10. Injektion von Pikrotoxin, welches zu heftigen, aber symptomatisch anderen Krämpfen wie die Insulinkrämpfe führte, bewirkte eine sehr starke Verminderung der Kohlehydrate, namentlich des Glykogens des Gehirns. Im Herzen ließ sich wieder eine Zunahme der Gesamtkohlehydrate nachweisen, ebenso war der Blutzuckergehalt erhöht. Die Abnahmen der Kohlehydrate in der Leber waren geringer als bei der früheren Methode der experimentellen Kohlehydratverarmung.

11. Die hinsichtlich des Gehirns mitgeteilten Tatsachen stellen den ersten Nachweis eines autonomen Kohlehydratstoffwechsels des Gehirns aus den Eigenbeständen desselben dar. Bei Erregungszuständen des Gehirns beteiligen sich die gefundenen Kohlehydrate am Stoffwechsel desselben.

Über die Hemmung der Serum- und Organlipase durch Jod.

Von

H. Vollmer, W. Schmidt und J. Serebrijski.

(Aus dem Kaiserin-Auguste-Viktoria-Haus.)

(Eingegangen am 1. Dezember 1924.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

Vor Jahresfrist machte der eine von uns die Zufallsbeobachtung, daß Zusatz weniger Tropfen alkoholischer Jodtinktur zum System Tributyrinlösung—Blutserum oder Tributyrinlösung—Organextrakt die lipolytische Kraft der Serum- und Organlipase zu hemmen oder aufzuheben vermag. Bei der Bedeutung, welche die Trennung verschiedener Fermente auf dem Wege der Giftanalyse insbesondere durch die Arbeiten *Ronas* und seiner Mitarbeiter gewonnen hat, erschien es uns lohnend, diese Jodwirkung näher zu studieren und die Untersuchungen auf die Fermente mehrerer Organe auszudehnen.

Methode.

Wir bedienten uns der stalagmometrischen Methode von *Rona* und *Michaelis* und ließen die Lipase des Blutserums und der Organextrakte auf gesättigte Lösung von gereinigtem Tributyrin einwirken, die immer frisch zubereitet und der auf je 100 ccm 8 ccm Phosphatgemisch im Verhältnis 1 primär : 7 sekundär zugesetzt wurden.

Bei der Herstellung der Organextrakte folgten wir im Prinzip den Angaben von *Rona* und *Pavlović*. Die Organe (Lunge, Leber, Milz, Niere, Pankreas) von möglichst frischen menschlichen Leichen wurden mit dem Hackmesser zu breiförmiger Konsistenz verkleinert und so lange in physiologischer Kochsalzlösung gespült, bis die Spülflüssigkeit annähernd blutfrei war. Der ausgewaschene Organbrei wurde mit gleichen Gewichtsteilen physiologischer Kochsalzlösung versetzt, mehrere Stunden im Schüttelapparat geschüttelt, durch Gaze filtriert, zentrifugiert, durch Filter filtriert und durch Toluolzusatz haltbar gemacht. Wir verarbeiteten nur frisch hergestellte Organextrakte von fünf verschiedenen Leichen.

Im allgemeinen ließen wir 0,5 bis 1,0 ccm Serum bzw. Organextrakt auf 25 ccm Tributyrinlösung einwirken und verfolgten die Spaltung bei Zimmertemperatur von 17 bis 18° C, indem wir die Tropfenzahl nach 1, 15, 30, 60 und 90 Minuten bestimmten. Die Wasserstoffionenkonzentration der Gemische wurde jeweils am Ende des Versuchs kolorimetrisch nach *Michaelis* bestimmt. Die Tropfenzahl unserer Pipette war für reines destilliertes Wasser 90, für gesättigte Tributyrinlösung etwa 135.

Wir verwendeten anfangs die offizinelle 10proz. Jodtinktur in 96proz. Alkohol, später eine $3\frac{1}{3}$proz., die sich in der wässerigen Tributyrinlösung besser löst und so in größeren Mengen zugesetzt werden kann. Von dieser gehen 25 bis 33 Tropfen leicht in Lösung und bilden eine klare, gelbbraune Flüssigkeit. Anfängliche Trübung hellt sich bald auf.

Wir ließen das Jod in einigen Versuchen 1 bis mehrere Stunden auf das Ferment einwirken und setzten erst dann das System der Tributyrinlösung zu. Da sich das Verfahren jedoch einfacher gestaltete und zum gleichen Ergebnis führte, fügten wir die Jodtinktur in den meisten Versuchen der Tributyrinlösung zu und ließen erst dann das Ferment einwirken. Dabei ist zu berücksichtigen, daß sich zwischen Jod und Tributyrin eine chemische Reaktion vollziehen könnte, deren Produkte eine andere Oberflächenaktivität besitzen als das Tributyrin, und so eine Beeinflussung des Ferments durch Jod nur vortäuschen könnte. Diese Möglichkeit ist schon durch folgenden Vorversuch mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen: Zusatz von 0,4 ccm 3⅓proz. Jodtinktur zu gesättigter Tributyrinlösung erhöht deren Tropfenzahl um 2 bis 3 Tropfen, während Zusatz gleicher Menge 96proz. Alkohols diese kaum erhöht (Tabelle I). Im Laufe von 2 Stunden sinkt die Tropfenzahl beider Gemische um ½ bis 1 Tropfen, wohl infolge der Verdunstung des oberflächenspannungserniedrigenden Alkohols. Der Jodtinktur kommt also eine ganz geringe oberflächenspannungsherabsetzende Wirkung zu. Jede eingreifende chemische Reaktion müßte aber in einer erheblichen Änderung der Tropfenzahl zum Ausdruck kommen.

Tabelle I.

Tributyrinzahl 135	Tropfenzahl in Minuten			
	1	30	60	90
25 Tributyrin + 0,4 Alkohol . . .	137,5	137,5	137,5	136,5
25 „ + 0,4 Tct. Jodi . .	135,5	135,5	135,5	135

Versuchsergebnisse.

Schon durch Zusatz von 2 Tropfen der 10proz. Jodtinktur wird — wie aus Abb. 1 zu erkennen ist — die lipolytische Wirksamkeit des menschlichen Serums stark beeinträchtigt.

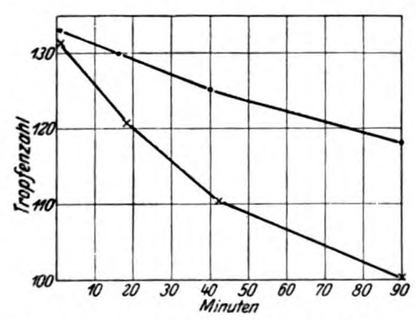


Abb. 1. 1 ccm Serum : 25 ccm Tributyrin, × ohne Zusatz, 0,2 Tropfen 10proz. Tct. Jodi.

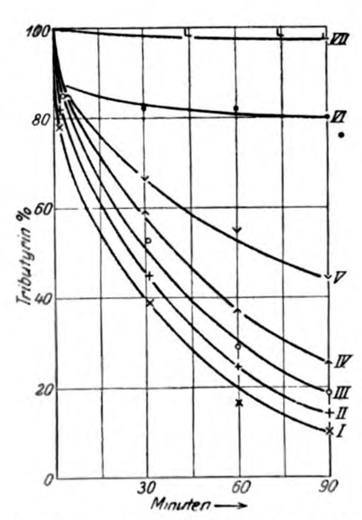


Abb. 2. 0,5 ccm Serum : 25 ccm Tributyrin, p_H 7,35. I. Ohne Zusatz ×, II. 0,025 ccm Tct. Jodi 3⅓ Proz. +, III. 0,05 desgl. ○, IV. 0,1 desgl. Λ, V. 0,2 desgl. V, VI. 0,4 desgl. ●, VII. 0,8 desgl. ⌊.

Wir untersuchten nun, wie die Fermentwirkung durch verschiedene Jodkonzentrationen beeinflußt wird, und teilen in Abb. 2 einen Versuch mit, in welchem zu je 25 ccm Tributyrinlösung, auf die je 0,5 ccm Serum einwirkten, verschiedene Jodmengen zugesetzt wurden, die in geometrischer Reihe mit dem Quotienten 2 ansteigen. Die Reihe zeigt steigende Lipasehemmungen mit steigender Jodkonzentration.

Um das Verhältnis zwischen beiden Faktoren näher zu charakterisieren, setzten wir die relative Jodkonzentration C zu der Geschwindigkeitskonstanten der Tributyrinspaltung $k = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{A}{A - x}$ einerseits, zu der prozentualen Lipasehemmung $h = \frac{k_0 - k_1}{k_1} \cdot 100$ andererseits in Beziehung. Stellt man das Ergebnis (Tabelle II) graphisch dar, indem man die C-Werte auf der Abszisse, die k- bzw. h-Werte auf der Ordinate abträgt, so erhält man in beiden Fällen eine gegen die Abszisse konvexe Parabel (Abb. 3 und 4). *Bei kleinen Jodkonzentrationen nimmt also die Geschwindigkeitskonstante relativ mehr ab als bei großen, und die Fermenthemmung h ist dementsprechend bei kleinen Jodkonzentrationen relativ größer als bei großen.* Faßt man die Jodwirkung als *Adsorptionswirkung* auf, so kann man die Gesetzmäßigkeit auch so ausdrücken: *bei kleinen Konzentrationen ist die Lipaseadsorption an Jod relativ größer als bei hohen Jodkonzentrationen.* Dieser Vorgang entspricht den Adsorptionsgesetzen.

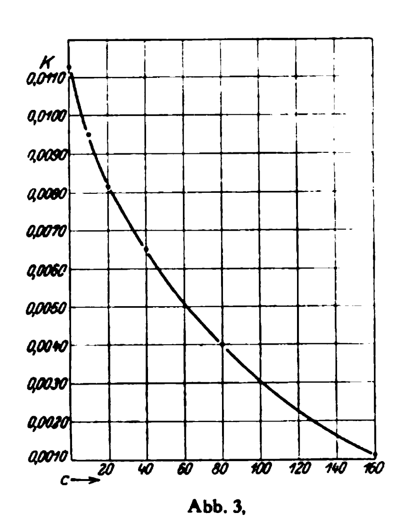


Abb. 3.

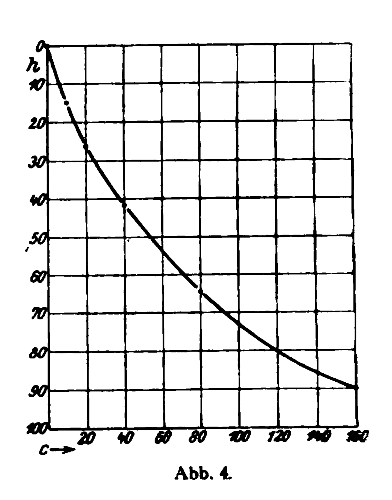


Abb. 4.

Logarithmiert man die aus h und C gewonnene Gleichung und trägt man auf der Abszisse die Logarithmen der Variablen C, auf der

Ordinate die Logarithmen der Variablen h ab, so erhält man die *Gleichung einer Geraden* (Abb. 5). Entsprechend der begrenzten Gültigkeit der Adsorptionsisothermen sieht man auf Abb. 5 den ersten und letzten Punkt merklich von der Geraden abweichen.

Tabelle II.

Nr.	Tct. Jodi $3^1/_3$ Proz. in ccm	Relative Jodkonzentration C	$\log C$	$k = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{A}{A-x}$	$h = \frac{k_0 - k}{k_0} \cdot 100$	$\log h$
1	0	0	0	0,011 11	0	0
2	0,025	10	1,000 00	0,009 49	14,6	1,164 35
3	0,05	20	1,301 03	0,008 14	26,76	1,427 49
4	0,1	40	1,602 06	0,006 50	41,54	1,618 47
5	0,2	80	1,903 09	0,003 96	64,4	1.808 89
6	0,4	160	2,204 12	0,001 08	90,36	1,955 98

Es war nun die Frage, ob die lipasehemmende Wirkung der Jodtinktur zum Teil *Alkoholwirkung* ist und, wenn nicht, ob sie nur der *molekularen Form des Jods* — wie sie in der Jodtinktur gegeben ist —

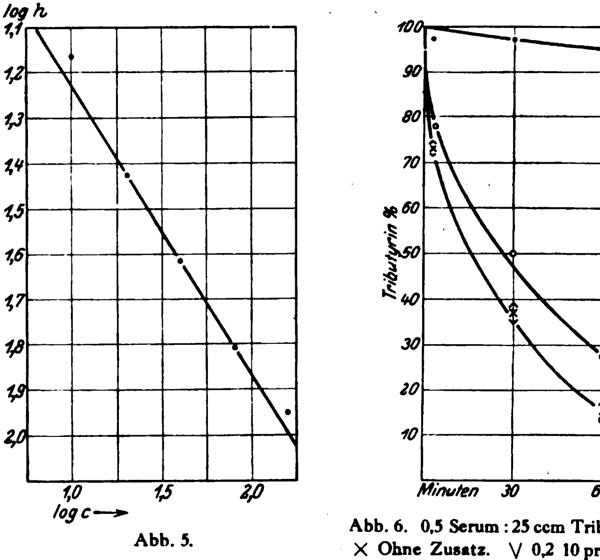


Abb. 5.

Abb. 6. 0,5 Serum : 25 ccm Tributyrin, p_H 7,4. × Ohne Zusatz. ∨ 0,2 10 proz. K J. ∧ 0,2 96 proz. Alkohol. ○ 0,025 10 proz. Tct. Jodi. ● 0,2 10 proz. Tct. Jodi.

zukommt, oder auch dem *ionisierten Jod*. In dem folgenden Versuch bedienten wir uns zur Beantwortung dieser Frage einer Anordnung, die wir auch für alle übrigen Versuche mit Organlipasen als Kontrolle beibehielten. Und zwar setzten wir in Kontrollreihen der Tributyrinlösung 96proz. Alkohol bzw. 10proz. KJ-Lösung in einer der bei-

gefügten Jodtinktur entsprechenden Menge zu. Es zeigte sich, daß *weder Alkohol noch KJ einen nennenswerten Einfluß auf die Fermentwirkung ausübt (Abb. 6)*, daß also die *Wirkung der Jodtinktur an das Jodmolekül gebunden* und offenbar eine *Adsorptionswirkung* ist.

In ähnlicher Weise wie auf die Blutlipase untersuchten wir die *Wirkung des Jodmoleküls auf das lipolytische Ferment der Lunge, Leber, Niere, Milz* und des *Pankreas* (Tabellen III bis XIV). Anfangs glaubten wir, eine verschiedene Jodwirkung bei verschiedenen Organlipasen feststellen zu können, da wir bei Lungenextrakten fast völlige Hemmungen (Tabellen III bis V), bei Pankreasextrakten dagegen keinen

Tabelle III.

Nr.	1 ccm Lungenextrakt : 25 ccm Tributyrin	Tropfenzahl in Minuten				p_H
		1	30	60	90	
1	Ohne Zusatz	136,5	127,0	117,0	107,5	7,35
2	5 Tropfen $3^1/_3$ proz. Tct. Jodi . .	139,0	135,5	132,5	121,5	7,35
3	25 „ $3^1/_3$ „ „ „ . .	**139,5**	**137,5**	**135,0**	**134,5**	7,35
4	25 „ 96 „ Alkohols . .	137,0	127,0	117,0	104,5	7,35
5	25 „ 10 „ KJ	137,0	128,0	117,5	105,0	7,35

Tabelle IV.

Nr.	1 ccm Lungenextrakt : 25 ccm Tributyrin	Tropfenzahl in Minuten				p_H
		1	15	30	60	
1	Ohne Zusatz	133,0	126,0	120,0	109,0	7,35
2	5 Tropfen $3^1/_3$ proz. Tct. Jodi . .	135,0	132,0	129,0	122,0	7,35
3	25 „ $3^1/_3$ „ „ „ . .	**137,5**	—	**135,5**	**133,5**	7,35
4	25 „ 96 „ Alkohols . .	133,0	127,5	118,5	107,0	7,35
5	25 „ 10 „ KJ	133,0	126,0	121,0	108,0	7,35

Tabelle V.

Nr.	1 ccm Lungenextrakt : 25 ccm Tributyrin	Tropfenzahl in Minuten				p_H
		1	30	60	90	
1	Ohne Zusatz	133,5	110,5	99,0	98	7,35
2	5 Tropfen $3^1/_3$ proz. Tct. Jodi . .	135,0	124,5	114,0	107	7,35
3	25 „ $3^1/_3$ „ „ „ . .	**139,5**	**136,5**	**134,5**	**131**	7,35
4	25 „ 10 „ KJ	133,5	109,5	101,5	101	7,35

Tabelle VI.

Nr.	1 ccm Pankreasextrakt : 25 ccm Tributyrin	Tropfenzahl in Minuten				p_H
		1	15	30	60	
1	Ohne Zusatz	105	98,5	96,0	96,0	7,35
2	5 Tropfen $3^1/_3$ proz. Tct. Jodi . .	107	101,0	98,5	98,5	7,35
3	25 „ $3^1/_3$ „ „ „ . .	**109**	**105,0**	**104,5**	**103,0**	7,35
4	25 „ 96 „ Alkohols . .	106	101,0	99,0	97,0	7,35
5	25 „ 10 „ KJ	105	98,5	98,0	96,0	7,35

oder nur einen geringen Einfluß des Jodzusatzes beobachteten (Tabelle VI). Diese Unterschiede stellten sich jedoch als abhängig von der Lipasekonzentration heraus. Aus fermentarmen Organextrakten kann das Ferment vollkommen an das Jod adsorbiert und so in seiner Wirkung aufgehoben werden. In den konzentrierten Fermenten ist das Adsorbens bald „gesättigt" und der nicht adsorbierte Fermentüberschuß, der gerade bei den hochwirksamen Pankreasextrakten ein Vielfaches der adsorbierten Fermentmenge ausmacht, kann ungehemmt seine tributyrinspaltende Wirkung entfalten. Bei 1000facher Verdünnung der Fermentkonzentration erhält man auch bei dem Pankreasextrakt eine totale Hemmung durch Jod (Tabelle VII).

Tabelle VII.

Nr.	0,05 ccm $^1/_{50}$ Pankreasextrakt : 25 ccm Tributyrin	Tropfenzahl in Minuten 1	30	60	90	p_H
1	Ohne Zusatz	125,0	112,0	101,0	99,0	7,35
2	2 Tropfen 10proz. Tct. Jodi . . .	136,5	135,5	134,5	134,0	7,35
3	10 „ 10 „ „ „ . . .	**140,0**	**139,5**	**139,0**	**138,5**	7,35

Auch die Lipase der Niere, Leber und Milz (Tabellen VIII bis XIV) *wird ebenso wie die der Lunge und des Pankreas je nach der Fermentkonzentration partiell oder total gehemmt.* Ein verschiedenes Verhalten der lipolytischen Fermente verschiedener Organe konnte nicht festgestellt werden.

Tabelle VIII.

Nr.	1 ccm Nierenextrakt : 25 ccm Tributyrin	Tropfenzahl in Minuten 1	15	30	60	p_H
1	Ohne Zusatz	130,0	102,5	101,0	93,5	7,25
2	5 Tropfen $3^1/_3$proz. Tct. Jodi . .	135,0	106,5	104,0	102,5	7,25
3	25 „ $3^1/_3$ „ „ „ . .	**135,0**	**132,5**	**132,0**	**131,0**	7,25
4	25 „ 96 „ Alkohols . .	129,0	109,5	101,5	100,0	7,25
5	25 „ 10 „ KJ	127,5	102,0	101,5	96,5	7,25

Tabelle IX.

Nr.	1 ccm Nierenextrakt : 25 ccm Tributyrin	Tropfenzahl in Minuten 1	15	30	60	p_H
1	Ohne Zusatz	129,0	102,0	101,0	98,5	7,35
2	5 Tropfen $3^1/_3$proz. Tct. Jodi . .	130,0	105,0	104,0	102,0	7,35
3	25 „ $3^1/_3$ „ „ „ . .	**133,0**	**131,5**	**129,5**	**125,0**	7,35
4	25 „ 96 „ Alkohols . .	129,5	103,5	103,0	99,5	7,35
5	25 „ 10 „ KJ	126,0	101,5	101,0	98,0	7,35

Tabelle X.

Nr.	1 ccm Milzextrakt : 25 ccm Tributyrin	Tropfenzahl in Minuten				p_H
		1	15	30.	60	
1	Ohne Zusatz	134,0	128,5	122,0	110,0	7,35
2	5 Tropfen $3^1/_3$ proz. Tct. Jodi . .	136,0	134,0	131,0	123,0	7,35
3	25 „ $3^1/_3$ „ „ „ . .	**137,0**	**136,5**	**136,0**	**134,5**	7,35
4	25 „ 96 „ Alkohols . .	134,0	128,5	122,5	112,0	7,35
5	25 „ 10 „ KJ	136,0	128,5	122,5	112,0	7,35

Tabelle XI.

Nr.	1 ccm Milzextrakt : 25 ccm Tributyrin	Tropfenzahl in Minuten				p_H
		1	30	60	90	
1	Ohne Zusatz	130,0	108,0	107,0	106,0	7,35
2	5 Tropfen $3^1/_3$ proz. Tct. Jodi . .	132,5	113,0	111,0	108,5	7,35
3	25 „ $3^1/_3$ „ „ „ . .	**138,5**	**136,0**	**128,0**	**123,0**	7,35
4	25 „ 96 „ Alkohols . .	136,0	108,0	108,0	108,5	7,35

Tabelle XII.

Nr.	1 ccm Leberextrakt : 25 ccm Tributyrin	Tropfenzahl in Minuten				p_H
		1	15	30	60	
1	Ohne Zusatz	117,5	99,5	97,5	96,5	7,25
2	5 Tropfen $3^1/_3$ proz. Tct. Jodi . .	118,5	103,5	100,5	99,5	7,25
3	25 „ $3^1/_3$ „ „ „ . .	**137,5**	**112,5**	**111,5**	**110,5**	7,25
4	25 „ 96 „ Alkohols . .	113,5	98,5	98,0	97,0	7,25
5	25 „ 10 „ KJ	112,0	102,5	100,5	99,5	7,25

Tabelle XIII.

Nr.	1 ccm Leberextrakt : 25 ccm Tributyrin	Tropfenzahl in Minuten				p_H
		1	15	30	60	
1	Ohne Zusatz	101,5	95,5	93,0	92,5	7,35
2	5 Tropfen $3^1/_3$ proz. Tct. Jodi . .	109,5	107,0	106,0	95,0	7,35
3	25 „ $3^1/_3$ „ „ „ . .	**132,0**	**109,5**	**106,0**	**105,0**	7,35
4	25 „ 96 „ Alkohols . .	100,5	95,5	93,0	92,5	7,35
5	25 „ 10 „ KJ	106,0	96,0	95,0	95,0	7,35

Tabelle XIV.

Nr.	1 ccm Leberextrakt : 25 ccm Tributyrin	Tropfenzahl in Minuten				p_H
		1	15	30	60	
1	Ohne Zusatz	123,5	101,5	100,0	96,5	7,3
2	5 Tropfen $3^1/_3$ proz. Tct. Jodi . .	122,0	105,0	103,0	100,5	7,3
3	25 „ $3^1/_3$ „ „ „ . .	**135,5**	**114,5**	**111,5**	**111,5**	7,3
4	25 „ 96 „ Alkohols .	120,0	103,5	103,5	102,5	7,3
5	25 „ 10 „ KJ	121,5	103,5	100,0	99,0	7,3

Nach Abschluß unserer Untersuchungen erschien eine Arbeit von *Pincussen* über den Einfluß aus Jodsalzen unter Bestrahlung abgespaltenen Jods auf verschiedene diastatische Fermente. Die Befunde *Pincussens* beweisen ebenso wie unsere Arbeitsergebnisse eine Jodempfindlichkeit verschiedener Fermente.

Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers.

Erfahrungen mit der Methode *Hagedorn-Jensen*[1]) mit der Umänderung nach *Dressel* und *Rothmann*[2]).

Von

Elisabeth Dingemanse.

(Aus dem pharmako-therapeutischen Laboratorium der Universität zu Amsterdam.)

(Eingegangen am 2. Dezember 1924.)

In dieser Zeitschrift (**153**, 97, 1924) erschien von der Hand von *C. Jimenez Diaz* und *B. Sanchez Cuenca* aus der medizinischen Klinik der Universität zu Sevilla eine Kritik an der durch *Dressel* und *Rothmann* angewandten Methode. Bekanntlich folgen letztere bei den Blutzuckerbestimmungen der Methode von *Hagedorn-Jensen*. Allein werden, an Stelle 0,1 ccm abzupipettieren, etwa 100 mg Blut in Löschpapierblättchen aufgesaugt und sofort mit der Torsionswage gewogen. *Dressel* und *Rothmann* fanden beim Vergleich der beiden Methoden sehr gut übereinstimmende Resultate.

Nun haben *Diaz* und *Cuenca* diese Methode gleichfalls ausprobiert und damit beinahe niemals übereinstimmende Werte erhalten, weder beim Vergleich der beiden Methoden, noch bei Doppelbestimmungen mit Löschpapierblättchen.

Bei den zahlreichen Tierversuchen im hiesigen Laboratorium, wobei öfters mehreremal pro Stunde der Blutzuckergehalt bestimmt werden mußte, mußte eine Methode angewandt werden, die möglichst wenig Blut erforderte.

Wir begannen mit der Original-*Hagedorn-Jensen*schen Methode und stellten dann fest, daß auch die Methode nicht an Genauigkeit einbüßt, wenn man sie so modifiziert, wie von *Dressel* und *Rothmann* angegeben. Diese Abänderung hat den Vorteil, daß man schneller arbeiten und mit weniger Blut auskommen kann.

---

[1]) Diese Zeitschr. **135**, 46, 1923; **137**, 92, 1923.
[2]) Ebendaselbst **146**, 538, 1924.

Die Methode wurde gemeinsam mit *Lippmann* und *Planelles*[1]) ausprobiert. Anfangs wurde mit Pipette und Löschpapierblättchen nebeneinander gearbeitet, später nur mit Löschpapierblättchen. Auf letztere Art wurden weit mehr als 1000 Blutzuckerbestimmungen mit sehr gut übereinstimmenden Resultaten gemacht, so daß wir glauben, immerhin eine gewisse Erfahrung auf diesem Gebiete zu haben.

Daß *Diaz* und *Cuenca* bei ihren Vergleichsbestimmungen, die sie bei demselben Individuum auch unter sonst gleichen Bedingungen in einem Zwischenraum von 24(!) Stunden getan haben, *verschiedene* Werte erhalten haben, glauben wir ohne weiteres. Bei Anwendung ein und derselben Methode würden sie auch solche verschiedene Werte gefunden haben. Es ist doch eine bekannte Tatsache, die wir bei unseren Versuchen auch immer beobachten konnten, daß der Blutzuckergehalt bei einem Individuum von Tag zu Tag ganz erhebliche Differenzen aufweisen kann. Aus ihren „Vergleichs"bestimmungen schließen *Diaz* und *Cuenca*: „Folglich ist die Blättchenmethode, wie sie bei der *Bang*schen Technik gebräuchlich, für die *Hagedorn-Jensen*sche Methode vollständig unbrauchbar, weil sie zu niedrige und niemals übereinstimmende Werte ergibt."

Aus unserem reichen Material wollen wir noch einige Zahlen anführen.

A. Im Blute bei Doppelbestimmungen mittels Löschpapierblättchen und Pipetten gefundene Werte:

	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3.
Pipette	0,163	0,124—0,144	0,160—0,162
Blättchen	0,161—0,164	0,133—0,138	0,153—0,155

B. Im Blute mit Löschpapierblättchen gefundene Werte aus etwa 1000 Bestimmungen willkürlich herausgegriffen:

1. 0,094—0,089	15. 0,086—0,083	28. 0,081—0,084
2. 0,082—0,082	16. 0,093—0,095	29. 0,096—0,095
3. 0,090—0,095	17. 0,106—0,109	30. 0,069—0,075
4. 0,078—0,080	18. 0,110—0,115	31. 0,052—0,065
5. 0,087—0,093	19. 0,116—0,118	32. 0,098—0,105
6. 0,088—0,094	20. 0,042—0,043	33. 0,102—0,106
7. 0,105—0,108	21. 0,110—0,113	34. 0,114—0,110
8. 0,090—0,088	22. 0,112—0,116	35. 0,116—0,117
9. 0,117—0,112	23. 0,051—0,057	36. 0,090—0,098
10. 0,095—0,098	24. 0,042—0,043	37. 0,084—0,083
11. 0,130—0,125	25. 0,125—0,125	38. 0,085—0,088
12. 0,126—0,126	26. 0,117—0,117	39. 0,064—0,069
13. 0,069—0,075	27. 0,121—0,115	40. 0,095—0,099
14. 0,063—0,059		

Die Werte unter 0,078 sind von Hunden und Kaninchen, die mit Insulin gespritzt sind.

[1]) Diese Zeitschr. **151**, 98, 1924.

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Differenzen bei den Doppelbestimmungen nicht größer sind als bei der *Bang*schen Methode, und daß auch beim Arbeiten mit Löschpapierblättchen nach *Hagedorn-Jensen* gut übereinstimmende Werte erhalten werden können.

Wir sind den Herren *Dressel* und *Rothmann* sehr dankbar, daß sie uns diese Vereinfachung der *Hagedorn-Jensen*schen Methode gelehrt haben, und würden diese nicht mehr missen wollen.

Bei den Analysen hat unser Institutsangestellter *Kemp* mit besonderer Sorgfalt mitgewirkt.

„Über Urochromogen“ usw.

Ergänzung zur Mitteilung von *Wm. O. Moor.*

Diese Zeitschr. **158**, 19, 1924.

Von *Folins* kolorimetrischer Methode der Harnsäurebestimmung habe ich erst vor kurzem Kenntnis erhalten, was dadurch zu erklären ist, daß mir viele Jahre hindurch die Fachliteratur nicht zugänglich war. Übrigens ist auch *Folin* nicht der Entdecker der blauen Wolframreaktion. Schon im Jahre 1877 veröffentlichte *O. Maschke* eine Arbeit in der Zeitschrift für analytische Chemie, in der er mitteilt, *daß eine Lösung von Wolframsäure in überschüssiger Lauge sich mit Harnsäure grün oder blau färbt.* Ferner tritt nach *Th. Offer dieselbe Reduktion* ein bei Verwendung von Phosphormolybdänsäure; Harnsäurelösungen scheiden das gebildete Molybdänoxyd sofort in mikroskopischen *tiefblauen* Prismen ab[1]). Nach neuen, von mir ausgeführten Versuchen kann ich nur wiederholen, daß die wesentlichste Ursache des Reduktionsvermögens des Harns und somit der blauen Wolfram- und der Berlinerblaureaktion der U-Stoff ist. Durch Phosphorwolframsäure wird nämlich die Harnsäure aus dem Urin *vollständig* gefällt[2]). Es ist somit leicht, die durch die Harnsäure bedingte Fehlerquelle zu beseitigen. Zu diesem Zwecke werden je 10 ccm Urin mit 2 Tropfen einer gesättigten Phosphorwolframsäurelösung und mit 1 Tropfen konzentrierter Salzsäure vermengt; das Filtrat ist frei von Harnsäure (und von Urochrom) und kann jetzt für die Wolfram- oder für die Berlinerblaureaktion verwendet werden[3]). *Der Unterschied im Reduktionsvermögen zwischen Filtrat und nativem Urin ist ein geringer.* Zu bemerken ist, daß die Intensität der Wolframreaktion genau proportional ist zur Intensität der Berlinerblaureaktion. Es genügt deshalb, die letztere allein anzuwenden. Näheres über diese so leicht ausführbare Probe ist in meiner letzten Arbeit angegeben.

---

[1]) Centralbl. f. Physiol. 1895.

[2]) *Schöndorff*, Pflügers Arch. 1895.

[3]) Bei verdünnten Harnen genügt 1 Tropfen Phosphorwolframsäure auf 10 ccm Urin. Eine geringfügige Beimengung dieser Säure wirkt schon störend auf die Berlinerblaureaktion.

Erfahrungen über die Vergärung des Dioxyacetons.

Von

C. Neuberg und A. Gottschalk.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Seitdem die Zucker der 3-Kohlenstoffreihe bekannt sind, hat es nicht an Untersuchungen über ihr Verhalten zu Hefe gefehlt; so weiß man, daß einige Hefen gegenüber der Ketotriose ein Vergärungsvermögen zeigen. Die Angaben hierüber haben deshalb ein Interesse, weil aus dieser Angreifbarkeit durch den Hefepilz Rückschlüsse hinsichtlich des Auftretens von Triosen im Verlaufe der alkoholischen Zuckerspaltung gezogen worden sind. *A. Slator*, *A. Harden* und *W. J. Young* sowie *C. Neuberg*, *E. Färber*, *A. Lewite* und *E. Schwenk* haben jedoch früher von den verschiedensten Gesichtspunkten aus darauf aufmerksam gemacht, daß jene Gärung der Triosen und namentlich die des Dioxyacetons anderer Art als die der Zymohexosen ist und daß es vorläufig zweifelhaft erscheinen muß, ob man aus jenem unsicheren und mäßigen Vergärungsvermögen Schlüsse über den Charakter der Triosen als Intermediärprodukte der Kohlenhydratspaltung ziehen kann. Neuerdings haben nun *H. O. L. Fischer* und *C. Taube*[1]) wiederum auf diese Verhältnisse hingewiesen und insbesondere auch angegeben, daß im Gegensatz zu zwei gegenüber Dioxyaceton von ihnen ganz wirkungslos befundenen Hefen eine untergärige Rasse, nämlich eine Hefe der Schultheiß-Patzenhofer-Brauerei, eine weitgehende, bis zu 80 Proz. reichende Vergärung innerhalb 36 Stunden zuwege brachte. Sie äußern dabei die Ansicht, daß hier eine vorangegangene Kondensation zu Hexose unter den von ihnen gewählten milden Bedingungen nicht in Frage kommen könne. Auch frühere Beobachter, die unter ähnlichen

---

[1]) *H. O. L. Fischer* und *C. Taube*, Ber. 57, 1502, 1924.

Verhältnissen gearbeitet haben, dürften nicht an eine rein chemische Kondensation gedacht haben, sondern an eine solche durch Agenzien, die in der Hefezelle selbst gelegen sind.

Es scheint uns nicht überflüssig, unsere im Laufe der Zeit gesammelten Erfahrungen über die Vergärbarkeit des Dioxyacetons unter verschiedenen Bedingungen und mit verschiedenen Heferassen bekanntzugeben. Die Tabellen, die beigefügt sind, lehren, daß keine einzige Hefe weder bei Zimmertemperatur noch bei 28^0, weder in Wasser noch nach Zusatz von Phosphat eine Vergärung bewirkt hat, die irgendwie zu vergleichen ist mit der zur Kontrolle stets vorgenommenen Vergärung der 6-Kohlenstoffzucker. Zu einer Zeit, wo weitgehende Vergärung der Hexosen bereits erfolgt war, ist im allgemeinen noch keine oder nur unwesentliche Kohlendioxydentwicklung aus dem Dioxyaceton eingetreten. Selbst bei dreitägiger Digestion von Dioxyaceton mit großen Hefemengen haben wir nur in einem einzigen Falle, mit der sich uns am günstigsten erweisenden Rasse, der Unterhefe Rotterdam, eine Vergärung von 81,9 Proz. erzielt. In vier Ansätzen ist eine Zerstörung der Triose zu etwa 50 Proz. erfolgt und fünfmal erreichte sie lediglich einen minimalen Grad. Während, wie schon erwähnt, die Glucose oder der Fruchtzucker in wenigen Stunden unter gleichen Bedingungen restlos verschwanden, wies selbst nach dreitägiger Aufbewahrung das Gemisch von Dioxyaceton und Hefe noch intensive Reduktion von *Fehling*scher Mischung in der Kälte auf.

Wir haben auch Versuche darüber angestellt, ob das Dioxyaceton von arbeitender Hefe, d. h. bei Vergärung von Rohrzucker, verändert wird. Dabei zeigte sich, wiederum im Einklang mit früheren Ergebnissen, daß Dioxyaceton die Gärung der Hexosen nicht behindert; sie verlief auch in Gegenwart der Triose stürmisch.

In einem Gärgemisch von 25 g Rohrzucker, 2,5 g Dioxyaceton und 25 g frischer Patzenhofer Unterhefe, zu dem nach 20 Stunden nochmals 25 g Rohrzucker gefügt wurden, war nach 3 Tagen noch starke Reduktion von *Fehling*scher Mischung in der Kälte zu erzielen, während der Rohrzucker der optischen Inaktivität zufolge vollkommen umgesetzt war. Nach wochenlanger Digestion des Gärgutes hielt die Reduktion an und blieb selbst nach 2 Monaten nicht völlig aus.

Die biologische Ungleichwertigkeit von Dioxyaceton und Hexose offenbart sich unter anderem auch darin, daß beispielsweise ein der Hefe nicht fern stehender Pilz Mucor stolonifer, der auf Lösungen von Fructose und selbst von Brenztraubensäure unter Zugabe der gewöhnlichen Mineralsalze und stickstoffhaltigen Nährstoffe üppig gedeiht, unter gleichen Bedingungen auf Dioxyaceton als Kohlenstoffquelle teils gar nicht, teils spurenhaft und erst nach Monaten zu wachsen begann.

Auf diese Verhältnisse hoffen wir später zurückkommen zu können.

Tabelle I.

Ansatz: 1 g frische Patzenhofer Bierhefe in 10 ccm Suspensionsflüssigkeit bei 18°.

Suspensionsflüssigkeit	ccm CO_2 nach Minuten bzw. Stunden												
	10′	20′	30′	40′	50′	60′	80′	90′	15½h	18½h	21h	24h	40h
Wasser	—	—	—	—	—	—	—	0,5	1,8	—	—	2,3	2,7
2 proz. Lösung von Dioxyaceton . .	—	—	0,8	—	—	2,2	—	3,4	18,1	20,2	21,0	22,4	26,1
2 proz. Lösung von *d*-Glucose . . .	4,9	13,2	19,5	24,3	29,0	33,2	36,6	—	42,8	—	—	43,6	47,7

Tabelle II.

Ansatz: 1 g frische Patzenhofer Bierhefe in 10 ccm Suspensionsflüssigkeit bei 18°.

Suspensionsflüssigkeit	ccm CO_2 nach Minuten bzw. Stunden												
	10′	20′	30′	40′	50′	60′	80′	90′	15½h	18½h	21h	24h	40h
0,6 proz. Lösung v. Monokaliumphosphat . . . ($p_H = 4,0$)	—	—	—	1,2	—	—	2,2	2,5	6,1	—	—	7,3	8,2
2 proz. Lösung v. Dioxyaceton in obiger Monokaliumphosphatlösung	—	—	0,9	—	—	2,7	—	3,9	16,3	18,7	19,7	20,9	25,0
2 proz. Lösung v. *d*-Glukose in obiger Monokaliumphosphatlösung	2,6	7,3	10,5	15,3	20,0	24,4	28,7	—	40,6	—	—	50,2	51,1

Tabelle III.

Ansatz: 1 g frische Unterhefe Radeberg in 10 ccm Suspensionsflüssigkeit bei 20°.

Suspensionsflüssigkeit	ccm CO_2 nach Stunden			Bemerkungen
	24h	48h	72h	
Wasser	8,4	10,7	12,5	—
2 proz. Lösung von Dioxyaceton . . .	14,3	18,9	23,5	Nach 72h reduziert das filtrierte Gärgut *Fehling*sche Lösung stark in der Kälte
2 proz. Lösung von *d*-Glucose	40,2	42,3	43,7	Nach 72h reduziert das filtrierte Gärgut *Fehling*sche Lösung nicht mehr

Tabelle IV.

Ansatz: 1 g frische Unterhefe Rotterdam in 10 ccm Suspensionsflüssigkeit bei 20°.

Suspensionsflüssigkeit	ccm CO_2 nach Stunden			Bemerkungen
	24h	48h	72h	
Wasser	11,6	14,3	16,0	—
2 proz. Lösung von Dioxyaceton . . .	21,8	32,0	37,2	Nach 72h reduziert das filtrierte Gärgut *Fehling*sche Lösung stark in der Kälte
2 proz. Lösung von *d*-Glucose . . .	41,9	44,3	45,4	Nach 72h reduziert das filtrierte Gärgut *Fehling*sche Lösung nicht mehr

Tabelle V.

Ansatz: 1 g frische Oberhefe Germania in 10 ccm Suspensionsflüssigkeit bei 19°.

Suspensionsflüssigkeit	ccm CO_2 nach Minuten bzw. Stunden										
	10′	20′	30′	40′	50′	60′	90′	150′	3h	24h	36h
Wasser	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	1,2	2,0
2 proz. Lösung von Dioxyaceton . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	0,7	—	0,9
2 proz. Lösung von *d*-Fructose	7,8	15,7	22,2	27,0	31,6	34,8	40,8	46,1	—	48,7	49,3

Tabelle VI.

Ansatz: 1 g frische Oberhefe Germania in 10 ccm Suspensionsflüssigkeit bei 34°.

Suspensionsflüssigkeit	ccm CO_2 nach Minuten bzw. Stunden										
	10′	20′	30′	40′	50′	60′	90′	150′	3h	24h	36h
Wasser	—	—	—	—	—	—	—	—	1,1	7,3	7,9
2 proz. Lösung von Dioxyaceton . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	0,9	2,1	2,3
2 proz. Lösung von *d*-Fructose	7,2	20,5	33,8	41,0	44,3	46,2	48,4	50,0	—	50,9	51,3

Tabelle VII.

Ansatz: 1 g frische Oberhefe *S.* u. *H.* in 10 ccm Suspensionsflüssigkeit bei 20°.

Suspensionsflüssigkeit	ccm CO_2 nach Minuten bzw. Stunden										
	10′	20′	30′	40′	50′	60′	70′	100′	160′	3h	18h
Wasser	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,4
2 proz. Lösung von Dioxyaceton . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,5	3,7
2 proz. Lösung von *d*-Fructose	7,6	16,0	20,4	25,5	29,4	32,6	35,5	40,3	42,7	—	43,5

Tabelle VIII.

Ansatz: 1 g frische Oberhefe Germania in 10 ccm Suspensionsflüssigkeit bei 20°.

Suspensionsflüssigkeit	ccm CO_2 nach Minten bzw. Stunden									
	10′	20′	30′	40′	50′	60′	90′	150′	3h	18h
Wasser	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,8
2 proz. Lösung von Dioxyaceton . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	1,6	1,8
2 proz. Lösung von *d*-Fructose	5,9	11,6	17,5	22,8	27,3	30,9	38,8	43,0	—	45,7

Tabelle IX.

Ansatz: 1 g Trockenhefe Patzenhofer in 10 ccm Suspensionsflüssigkeit bei 20°.

Suspensionsflüssigkeit	ccm CO_2 nach Stunden	
	24h	48h
Wasser	14,7	15,7
2 proz. Lösung von Dioxyaceton .	19,5	21,8
2 proz. Lösung von *d*-Glucose . .	51,8	52,6

Tabelle X.

Ansatz: 1 g frische Patzenhofer Bierhefe in 10 ccm Suspensionsflüssigkeit bei 20°.

Suspensionsflüssigkeit	ccm CO_2 nach Stunden		Bemerkungen
	24h	48h	
Wasser	3,9	4,6	—
2 proz. Lösung von Dioxyaceton . . .	7,1	9,0	Nach 48h reduziert das filtrierte Gärgut *Fehling*sche Lösung stark in der Kälte
2 proz. Lösung von *d*-Glucose	46,0	46,8	Nach 48h reduziert das filtrierte Gärgut *Fehling*sche Lösung nicht mehr

Der Vergleich von Tabelle I und X lehrt, wie das Vergärungsvermögen der selben Hefe gegenüber Dioxyaceton zu verschiedenen Zeiten schwankte, während es für Hexose unverändert blieb; den Zahlen der Tabellen I und II kann man entnehmen, daß Zugabe von Phosphat keine günstigeren Vergärungsbedingungen für das Dioxyaceton schuf.

Untersuchungen über die Phosphorylierung.

Von

A. Gottschalk und C. Neuberg.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Seit fast 20 Jahren weiß man, daß bei untergärigen Hefen die Eigenschaft verbreitet ist, nach Überführung in die Trockenform oder in Acetondauerpräparate zugefügte anorganische Phosphate an Zucker zu binden und damit Hexose-di-phosphat zu erzeugen (*Harden* und *Young*, *Iwanow*, 1905). In frischem Zustande geht den Unterhefen diese Fähigkeit zur sichtbaren Phosphorylierung ab. Weiter hat sich herausgestellt, daß bei den obergärigen Hefen, wie sie in Deutschland zu Gebote stehen, im allgemeinen dieses Vermögen der Zymophosphatbildung nicht zutage tritt. In frischem Zustande verestern sie gar nicht, und für gewöhnlich auch nach Verwandlung in eine Dauerform höchst unvollkommen (*Neuberg*, 1917 und *v. Euler*, 1918). In manchen Fällen lassen sich bei frischen Hefen durch Beigabe von Toluol Bedingungen schaffen, die denen der Dauerpräparate gleichen, indem bei Zusatz dieses Protoplasmagiftes eine Fähigkeit zur Hervorbringung des Kohlenhydrat-phosphorsäure-derivats offenbar wird. Allein durchgehends ist ein solches Verhalten nicht zu beobachten, da es obergärige wie untergärige Heferassen gibt, die auch in Gegenwart von Toluol veresterungsunfähig bleiben. Man kennt außerdem Hefen, die zwar nicht zu den eigentlichen Kulturrassen gehören, aber gleich diesen eine ganz typische alkoholische Zuckerspaltung zuwege bringen, ohne zu verestern (*Svanberg*, 1919).

Es erhebt sich nun die Frage, worauf ein scheinbar so grundsätzlich verschiedenes Verhalten der in ihrem Chemismus und in ihrer Morphologie einander nahestehenden Mikroorganismen zurückzuführen ist. Eine Klärung brachte die Untersuchung des Teilvorganges der alkoholischen Gärung, in dem sich diese Phosphorylierung vollzieht. Der Eintritt der alkoholischen Zuckerspaltung ist nach der Entdeckung von *Harden* und *Young* an die Anwesenheit des Coferments geknüpft; dies ist jener kochbeständige Bestandteil der Hefezellen, den diese

sowohl in frischem Zustande an siedendes Wasser als in trockenem Zustande auch bei einfacher Auslaugung mit kaltem Wasser abgeben, und der aus Hefepreßsaft durch Dialyse oder Ultrafiltration entfernt werden kann. Zwei von einander unabhängige Befunde wiesen nun darauf hin, daß die Betätigung des Coferments unter den ersten Phasen des Zuckerzerfalls zu suchen sei. Zunächst haben *Neuberg* und *Rosenthal* (1913) sowie *Harden* (1913) gezeigt, daß die Carboxylase, die in der 3-Kohlenstoffreihe angreift, ohne das Coferment ihre Gärleistung vollbringt. Sodann haben *Neuberg* und *Schwenk* (1915) sowie *Harden* (1917) bei Versuchen, das Coferment durch chemisch definierte Körper zu ersetzen, festgestellt, daß für das Zustandekommen der Cofermentwirkung Phosphationen unerläßlich sind. *Meyerhof*, der einen mit dem Coferment der Hefe verwandten oder identischen Stoff in den tierischen Geweben gefunden hat, hat 1918 den Gedanken formuliert, daß das Coferment für die Bindung des Phosphats im Gärungsverlauf unentbehrlich sei. Derselben Anschauung hat bezüglich eines Phosphorylierung zeigenden Milchsäurebazillus, des Bacterium casei ε, *Virtanen* (1924) Ausdruck verliehen; er hat angegeben, daß seine ausgewaschenen und so von Coferment befreiten Milchsäurebakterien nicht mehr zur Zymophosphatbildung fähig waren. Den Versuch, daß zugefügtes Coferment auch die Phosphorylierung kompletiert, genau wie es die *Gärung* wieder herstellt, hat der Autor nicht ausgeführt, wohl aber haben *v. Euler* und *Myrbäck* (1924) dargetan, daß mit zunehmenden Mengen Coferment cozymasefreie, ausgewaschene Hefe steigende Quantitäten von Zymophosphat hervorbringt. Sie ziehen daraus den Schluß, daß die Entstehung von Phosphorsäureester aus den Hexosen oder möglicherweise eine noch frühere Umwandlung des Zuckers diejenige Reaktionsstufe ist, zu welcher die Mitwirkung des Coferments erforderlich ist.

Auf Grund dieser Umstände war es nun möglich, einen Einblick in das abweichende und früher schwer zu deutende Verhalten der Oberhefen zu tun. Während es leicht durchführbar ist, aus Unterhefe durch Aceton ein Präparat zu bereiten, das phosphorylierend wirkt und zugefügte Phosphate sogar praktisch quantitativ an Zucker bindet, gelingt dieser Versuch bei verschiedenen darauf geprüften obergärigen Heferassen nicht. Wie schon *Hayduck* und *Haehn* in einer wichtigen Arbeit (1922) gezeigt haben, findet bei der Herstellung von Acetonoberhefen eine mehr oder minder weitgehende Zerstörung des Coferments statt; es bleibt dahingestellt, ob dies an einer besonderen Empfindlichkeit des Coferments aus Oberhefe oder an einem geringeren Gehalt der Oberhefe an Coferment oder an anderen Bedingungen liegt. Neu und die Verhältnisse aufhellend ist die Beobachtung, die wir gemacht haben, daß eine solche nicht veresterungsfähige Acetonoberhefe eine

Phosphorylierungskraft zu 100 Proz. gewinnt, sobald man Coferment, d. h. Kochsaft aus Unterhefe, zugibt.

Für die untergärigen Hefen geht das Verhalten bezüglich der Phosphorylierung bei Acetonhefe und Trockenhefe parallel. Etwas anders finden wir die Verhältnisse bei den in den Dauerzustand versetzten Oberhefen. Unsere trockenen obergärigen Hefen phosphorylieren zu 10 bis 20 Proz. Die Fähigkeit zur Veresterung wird nun durch Cofermentzusatz nicht erhöht, und zwar deshalb nicht, weil aus vorläufig noch nicht ganz durchsichtigen Gründen die deutschen Oberhefen zumeist keine Zymase nach außen hin abgeben. Da sich nun aller Wahrscheinlickeit nach die auf Zusatz abnormer Phosphatmengen stattfindende Anreicherung von Hexose-di-phosphat an der Zellgrenzschicht oder außerhalb der Zelle abspielt, kann es in diesem Falle nicht zu der selben Ansammlung von Zymophosphat kommen, wie es bei Zubereitungen von Unterhefen oder auch bei der sich in dieser Beziehung gleich verhaltenden Acetonoberhefe in Gegenwart hinreichender Mengen Coferment geschieht. So konnte der eine von uns (*Neuberg*, 1920) früher schon darauf hinweisen, daß die *massenhafte Anhäufung* von Hexose-di-phosphat weniger als eine physiologische Erscheinung zu deuten ist, sondern vielleicht mehr als ein abnormer, künstlich erzwungener Prozeß zu betrachten ist.

Wenn das Coferment der tierischen Zelle gleiche Funktionen erfüllt, so war zu erwarten, daß eine von ihrer natürlichen Cozymase befreite Hefe durch animalisches Coferment zur Phosphorylierung befähigt wird. Dies ist in der Tat der Fall.

Kochsaft aus Kaninchenmuskulatur setzt ausgewaschene, nicht veresternde Acetonunterhefe sowie nicht Phosphat bindende Acetonoberhefe in den Stand, zu 50 bis 60 Proz. zu phosphorylieren.

Weiterhin ergab sich, daß man Tumorzellen durch Auswaschen von Coferment ihr in der Norm sehr starkes glykolytisches Vermögen (*Warburg*) nehmen kann.

Die einzelnen experimentellen Belege für die erwähnten Verhältnisse sowohl bei der Hefegärung als bei der tierischen Zelle sollen aus äußeren Gründen später in anderem Zusammenhang gebracht werden.

Neue Untersuchungen über die Vergärung der Oxalessigsäure.

Von

C. Neuberg und G. Gorr.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Die *Oxalessigsäure* ist im Jahre 1911 in den Kreis der biochemisch interessanten Substanzen eingetreten durch den Befund von *C. Neuberg* und *L. Tir*[1]), daß diese Substanz von Hefe regelrecht vergoren wird. Wie sodann *C. Neuberg* und *L. Karczag*[2]) dargetan haben, wird jene Säure durch Hefe und aus ihr gewonnene Carboxylasepräparate in Kohlendioxyd und Acetaldehyd, $COOH.CH_2.CO.COOH = CH_3.COH + 2CO_2$, zerlegt. Die erwähnten Untersuchungen waren an der malenoiden Form der Oxalessigsäure ausgeführt, die bei 152° schmilzt; auch das andere Isomere der Oxalessigsäure, die Oxy-fumarsäure, die sich nach *A. Wohl* und *P. Claussner*[3]) bei 184° verflüssigt und durch Umlagerung aus der Oxy-maleinsäure entsteht, hat sich nach Versuchen von *P. Mayer*[4]) als im gleichen Sinne vergärbar herausgestellt. Die Oxalessigsäure, die bis dahin nur als ein Erzeugnis des Laboratoriums hatte gelten können, hat sich bald auch nach anderer Richtung hin als physiologisch bedeutsam erwiesen. Sie ist als Oxobernsteinsäure die zu dem Eiweißspaltungsprodukt Asparaginsäure gehörige α-Ketosäure. Bei der bakteriellen Zersetzung liefert die Oxalessigsäure — analog der ihr nahestehenden Brenztraubensäure — die flüchtigen Fettsäuren Essigsäure sowie Ameisensäure unter gleichzeitiger Entwicklung von Wasserstoff bzw. geringen Mengen Methan[5]).

---

[1]) *C. Neuberg* und *L. Tir*, diese Zeitschr. **32**, 330, 1911.

[2]) *C. Neuberg* und *L. Karczag*, ebendaselbst **36**, 72, 1911; Ber. **44**, 2477, 1911.

[3]) *A. Wohl* und *P. Claussner*, Ber. **40**, 2308, 1907.

[4]) *P. Mayer*, diese Zeitschr. **50**, 283, 1913.

[5]) *C. Neuberg* und *J. Jamakawa*, ebendaselbst **67**, 90, 1914.

Für die Brenztraubensäure hat sich später ergeben[1]), daß sie nicht nur den einfachen carboxylatischen Zerfall in Acetaldehyd und Kohlendioxyd unter dem Einflusse des Hefeferments erleidet, sondern auch ein Baumaterial für die carboligatische Synthese ist, wobei der aus ihr entwickelte Acetaldehyd im status nascens mit fremden Aldehyden zu Acyloinen im Sinne der Gleichung $R.CHO + HOC.CH_3 = R.\overset{*}{C}HOH.CO.CH_3$ zusammentritt. Ferner hat *J. Hirsch*[2]) erwiesen, daß ohne besonderen Zusatz eines anderen Aldehyds der aus der Brenztraubensäure abgespaltene Acetaldehyd sich mit nachgebildetem Acetaldehyd zum einfachsten Acyloin, dem Acetoin, zusammenschließen kann, und weiter hat sich gezeigt, daß man durch Anwendung eines Gemisches aus fertigem Acetaldehyd und Brenztraubensäure die Ausbeute an Acetoin zu steigern vermag[3]).

Die carboligatische Reaktion ist ein beachtenswerter Vorgang. Sie kann rein enzymatisch ausgeführt werden und liefert mit strukturell inaktiven Abbauprodukten des Zuckers, mit Brenztraubensäure und Acetaldehyd, durch Resynthese gewissermaßen ein unvollkommenes Kohlenhydrat. Das Acetoin teilt mit den échten Zuckern z. B. das starke Reduktionsvermögen, die optische Drehkraft und die markante Nachbarstellung von Carbonyl- und Hydroxylgruppe in der geradlinigen Kohlenstoffkette. Daher überlegten wir, ob es außer der Brenztraubensäure noch eine zweite α-Ketosäure gibt, die in die carboligatische Synthese einzubeziehen ist. Unsere Erwartung hat sich zunächst für die *Oxalessigsäure* erfüllt.

Wir beschreiben im folgenden, daß bei der einfachen Vergärung der Oxalessigsäure durch Hefe außer *Acetaldehyd* beträchtliche Mengen *Acetoin* gefaßt werden können. Die Ausbeute an Acetoin kann Schwankungen unterliegen, doch haben wir mindestens 15 Proz. der durch Vergärung umgesetzten Säure an Acyloin erhalten.

Acetaldehyd und Acetoin sind nun aber nicht die einzigen Umwandlungserzeugnisse der Oxalessigsäure. Zwar mag man letztere formelgemäß als Carboxy-brenztraubensäure auffassen, allein ihr physiologisches Verhalten ist doch anders, als wenn die Säure in Berührung mit biologischen Katalysatoren einfach in Kohlendioxyd und Brenztraubensäure zerfiele; denn zunächst hat sich ergeben, daß auch eine Reduktion zu *Äpfelsäure* stattfindet, und zwar in asymmetrischem Sinne. Bei der Vergärung von Brenztraubensäure mit frischen Hefen haben früher *C. Neuberg* und *J. Kerb*[4]) eine Bildung von Milchsäure

[1]) *C. Neuberg* und *J. Hirsch*, diese Zeitschr. **115**, 282, 1921; *C. Neuberg* und *L. Liebermann*, ebendaselbst **121**, 311, 1921.

[2]) *J. Hirsch*, ebendaselbst **131**, 178, 1922.

[3]) *C. Neuberg* und *O. Rosenthal*, Ber. **57**, 1436, 1924.

[4]) *C. Neuberg* und *J. Kerb*, diese Zeitschr. **62**, 489, 1914.

vermißt, und ihre Beobachtungen stehen im Einklang mit denen von *M. Oppenheimer*[1]), der Hefesaft angewendet hat. Das abweichende Verhalten der Oxalessigsäure kann vielleicht darauf zurückgeführt werden, daß die Brenztraubensäure zu ganz überwiegendem Maße als Ketosäure, die Oxalessigsäure dagegen als Enolgebilde, und zwar in unserem Falle als Oxy-maleinsäure, in den Gärgemischen enthalten ist. Durch diesen Übergang von Oxalessigsäure in Äpfelsäure gewinnt die mehrfach theoretisch bereits zur Erwägung gestellte Rolle der Oxalessigsäure bei den Umwandlungen in der Bernsteinsäurereihe an Bedeutung. Vor Jahren hat der eine von uns beobachtet[2]), daß auffallenderweise die selbst gegen konzentrierte Salpetersäure beständige Bernsteinsäure bei Behandlung mit verdünntem Wasserstoffsuperoxyd plus Eisensalz und sogar bei einfacher Belichtung ihrer wässerigen Lösung[3]) Acetaldehyd liefert. Demselben Schicksal unterliegen die um zwei Wasserstoffatome ärmeren beiden stereoisomeren Säuren Fumarsäure und Maleinsäure[4]). Wir haben[2])[4]) daraus gefolgert, daß der Weg von Bernsteinsäure bzw. Fumarsäure und Maleinsäure über die Äpfelsäure zur Oxalessigsäure führt und daß diese dann den Zerfall in Kohlendioxyd und Acetaldehyd erfährt, ähnlich wie bei der durch die Carboxylase fermentativ bedingten Spaltung. Auf Grund neuer Versuche ist jüngst *H. Wieland*[5]) zu einer ähnlichen Anschauung gekommen. Für das zugehörige stickstoffhaltige Derivat, die Asparaginsäure, hat *H. D. Dakin*[6]) den Übergang in Acetaldehyd auf chemischem Wege bewirkt, und, im Hinblick auf die Fäulnisversuche von *Neuberg* und *Jamakawa* (l. c., 1914), ist von *A. Blanchetière*[7]) und *E. Aubel*[8]) sowie von *J. H. Quastel*[9]) die Oxalessigsäure bei den bakteriellen Umwandlungen in der Bernsteinsäurereihe wohl mit Recht als Zwischenprodukt in Betracht gezogen worden. Unsere Versuche erbringen den Beweis, daß tatsächlich die Oxalessigsäure bei einem Gärungsvorgang zu Äpfelsäure werden kann, d. h. ohne Änderungen am Kohlenstoffskelett in das ihr so nahestehende Produkt auf physiologischem Wege übergeführt wird.

Als einen weiteren Stoff der 4-Kohlenstoffreihe haben wir noch einen zweiwertigen Alkohol aufgefunden, das *β, γ-Butylenglykol*, $CH_3 . CHOH . CHOH . CH_3$. Die Bildungsweise dieses Körpers ist

[1]) *M. Oppenheimer*, H. **89**, 58, 1914.
[2]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **67**, 71, 1914.
[3]) *Derselbe*, ebendaselbst **67**, 59, 1914.
[4]) *C. Neuberg* und *O. Rubin*, ebendaselbst **67**, 77, 1914.
[5]) *H. Wieland*, Ann. **436**, 248, 1924.
[6]) *H. D. Dakin*, Journ. of biol. Chem. **5**, 409, 1909.
[7]) *A. Blanchetière*, Ann. de l'Inst. Pasteur **34**, 392, 1920.
[8]) *E. Aubel*, C. r. **173**, 179, 1921.
[9]) *J. H. Quastel*, Biochem. Journ. **18**, 365, 1924.

klar. Es liegt nicht etwa ein Umbau innerhalb des Oxalessigsäuremoleküls vor, sondern das Butandiol verdankt seine Entstehung carboligatischem Aufbau aus zuvor erzeugtem Acetaldehyd. Das aus diesem hervorgehende Acetoin kann, wie schon *C. Neuberg* und *F. F. Nord*[1]) bei Versuchen mit Diacetyl angegeben haben, durch Hefe weiter zu 2, 3-Butylenglykol hydriert werden, und es ist wohl kaum zweifelhaft, daß man bei Verarbeitung großer Mengen Ausgangsmaterial, wie sie uns hier zur Verfügung standen, neben dem Acetoin unter geeigneten Verhältnissen öfter dem Butylenglykol begegnen wird; hierauf weist auch das Auftreten dieses Körpers bei verschiedenen Bakteriengärungen hin.

Man hat also im Falle der biochemischen Umwandlung von Oxalessigsäure durch Hefe das interessante Ergebnis, daß aus dieser vier Kohlenstoffatome enthaltenden Säure, außer dem direkten Spaltungsprodukt Acetaldehyd und dem unmittelbaren Reduktionsprodukt Äpfelsäure, zwei Substanzen der 4-Kohlenstoffreihe entstehen, die auf einem komplizierten synthetischen Wege — nach vorherigem Abbau durch Wiederaufbau — erzeugt worden sind und keineswegs durch irgendwelche Umwandlungen der unverkürzten Kohlenstoffkette des Ausgangsmaterials. Die Untersuchung der Oxalessigsäure wird nach verschiedenen Richtungen fortgesetzt werden, insbesondere wollen wir ihre Umwandlungen durch Pilze und Bakterien studieren. In der Oxalessigsäure liegt insofern ein beachtenswerter Körper vor, als ihre Benutzung die Möglichkeit gewährt, sozusagen *naszierende Brenztraubensäure* in biochemische Handlungen einzuführen; denn *eine* Stufe ihrer Umformungen besteht in der Loslösung von 1 Mol. Kohlendioxyd, die zur Brenztraubensäure hinleitet. Die Oxalessigsäure wird übrigens, wie wir schon heute bemerken wollen, auch in Gegenwart von schwefligsauren Salzen vergoren, genau wie die Brenztraubensäure und andere Ketosäuren.

Zu den folgenden Versuchen diente die *Oxy-maleinsäure*, die wir aus Oxalessigsäure-äthylester nach der eleganten Methode von *L. J. Simon*[2]) bereitet haben. Als Hefe erwiesen sich untergärige Sorten als brauchbar, während die Einwirkung der uns gerade zur Verfügung stehenden Oberhefe nicht nur sehr viel längere Zeit erforderte, sondern auch unvollständig blieb.

I. Nachweis von Acetoin.

a) 13,2 g Oxalessigsäure wurden in 1050 ccm Wasser gelöst und zur Abstumpfung der stark sauren Reaktion mit $^1/_{10}$ ihres Gewichtes an reinem Kaliumacetat versetzt. Hierzu kamen 300 g Unterhefe Patzenhofer. An einer kleinen Probe des Gemenges, die in ein Eudio-

[1]) *C. Neuberg* und *F. F. Nord*, Ber. **52**, 2248, 1919.
[2]) *L. J. Simon*, C. r. **137**, 855, 1903.

meter gefüllt war, überzeugten wir uns, daß nach etwa einer Stunde lebhafte Kohlendioxydentwicklung im Gange war. Dieselbe hielt längere Zeit an; wir ließen das Gemisch in der Regel 48 Stunden stehen. Die Vergärung erfolgte bei Zimmertemperatur, bei etwa 19^0. Alsdann geschah die Aufarbeitung in der von *C. Neuberg* und *A. v. May*[1]) angegebenen Weise. Das Gärgut wurde filtriert; von der klaren Flüssigkeit wurden 900 ccm mit einer Lösung von 8 g p-Nitrophenylhydrazin in alkoholischer Essigsäure versetzt und $2\frac{1}{2}$ Stunden im siedenden Wasserbade gekocht. Das dabei ausgefallene p-Nitrophenylosazon des Acetoins wurde noch vor völligem Erkalten der Flüssigkeit abgesaugt, mit warmem Alkohol sowie mit Äther gründlich gewaschen und dann nochmals mit Alkohol ausgekocht. Als violettrote Masse hinterblieben 3,5 g Acetoin-p-nitrophenylosazon, die nach ihrem Schmelzpunkt 304^0 schon recht rein waren. Nach dem Umkristallisieren aus Pyridin-Eisessig oder Benzonitril erhielten wir die Verbindung vom richtigen Schmelzpunkt 319^0. Die Analyse bestätigte das Vorliegen des Acetoinderivats.

0,0590 g Substanz: 12,0 ccm N_2 (19^0, 773,7 mm).

$C_{16}H_{16}N_6O_4$. Ber. N = 23,59 Proz.; gef. N = 23,69 Proz.

b) In einem zweiten Versuch gelangte sodann ein Gärgut zur Verarbeitung, das durch Digestion von 66 g Oxalessigsäure und 6,6 g Kaliumacetat in 5000 ccm Wasser mit 660 g Hefe gewonnen worden war. Gesamtvolumen 5,7 Liter. Aus 570 ccm klar filtrierter Flüssigkeit wurden bei der unter a) geschilderten Behandlung 0,9 g p-Nitrophenylosazon erzielt. Diese Ausbeute entspricht 15 Proz. der angewendeten Menge Oxalessigsäure.

II. Nachweis von Äpfelsäure.

a) 100 ccm der bei I a) erhaltenen Gärflüssigkeit wurden im Vakuum eingeengt, mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht, von den ausgefallenen flockigen Substanzen abfiltriert und sodann mit gepulvertem Bleiacetat sowie Bleiessig versetzt, bis keine Fällung mehr auftrat. Zu dem Gemenge wurde das gleiche Volumen Alkohol gegeben. Nach Stehen über Nacht wurde abfiltriert, mit verdünntem Alkohol ausgewaschen und die Bleiverbindung nach gründlichem Verreiben mit Wasser durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom Bleisulfid wurde wiederum eingeengt und nun mit Natronlauge neutralisiert, mit Essigsäure und Uranylacetat gemäß der Vorschrift von *K. Ohta*[2]) versetzt, die auf *P. Waldens*[3]) einschlägige Befunde zurückgeht. Die

[1]) *C. Neuberg* und *A. v. May*, diese Zeitschr. **140**, 299, 1923.

[2]) *K. Ohta*, diese Zeitschr. **44**, 481, 1912.

[3]) *P. Walden*, Ber. **30**, 2889, 1897; **32**, 2849, 1899.

klar filtrierte Flüssigkeit zeigte im 1-dcm-Rohr eine Ablenkung von $-0{,}2^{0}$, während die uranfreie Lösung kein Drehungsvermögen aufgewiesen hatte. Aus der Drehungssteigerung durch das Salz des sechswertigen Urans war auf die Gegenwart von Äpfelsäure zu schließen. Um deren Auftreten mit Sicherheit festzustellen, wurde ein Versuch im großen vorgenommen.

b) 23,15 g Oxalessigsäure wurden mit Hefe und Wasser unter den mehrfach angegebenen Verhältnissen vergoren. Die Aufarbeitung geschah diesmal im Anschluß an eine Vorschrift von *H. D. Dakin*[1]), die dieser Forscher für den Nachweis von Äpfelsäure bei der Umwandlung von Fumar- und Maleinsäure in Äpfelsäure durch Muskelgewebe gegeben hat. Zu diesem Zwecke wurde das filtrierte Gärgut zunächst im Vakuum auf 20 ccm eingeengt. Der Rückstand wurde mit gesättigtem Barytwasser schwach alkalisch gemacht. Von dem entstandenen Niederschlag wurde alsbald abfiltriert und ein Überschuß von Baryt durch Einleiten von Kohlensäure entfernt. Die wiederum filtrierte Lösung wurde abermals konzentriert und nunmehr mit 10proz. Bleiacetatlösung behandelt. Wir gaben zunächst nur einige Tropfen der Bleilösung hinzu und verwarfen den entstandenen ersten Niederschlag. Das Filtrat von diesem wurde mit Bleiacetat ausgefällt. Nach Stehen über Nacht wurde die Bleiverbindung abgesaugt und anfangs mit 50proz., später mit 96proz. Alkohol nachgewaschen. Der Bleiniederschlag wurde alsdann mit Wasser fein angerieben und durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Das wasserklare Filtrat vom Schwefelblei wurde auf 40 ccm eingedampft, mit festem Bariumcarbonat in der Wärme geschüttelt und heiß filtriert. Die Lösung, die keine Chlorionen mehr enthielt, wurde mit Tierkohle in der Siedehitze entfärbt und darauf mit konzentriertem Silbernitrat versetzt. Das sofort ausfallende und sich kaum schwärzende Silbersalz wurde nach 12stündiger Aufbewahrung in der Kälte abgesaugt und mit 50proz. sowie schließlich mit absolutem Äthylalkohol so lange ausgewaschen, bis keine Nitratreaktion mit Diphenylamin plus konzentrierter Schwefelsäure mehr erhalten werden konnte. Der Silberniederschlag wurde darauf in Wasser fein verteilt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die klar filtrierte Flüssigkeit lieferte beim Eindampfen im Vakuum einen schwach gelblichen Sirup, der nach 3 Tagen nahezu vollständig kristallisierte. Durch wiederholtes Umkristallisieren aus Aceton-Chloroform gelang die Gewinnung reiner Äpfelsäure; erhalten wurden 0,35 g vom Schmelzpunkt 101^{0}.

Zur Analyse wurde über das Ammonsalz in gewohnter Weise das äpfelsaure Silber hergestellt. Es war rein weiß und gab gut stimmende Werte.

[1]) *H. D. Dakin*, Journ. of biol. Chem. **52**, 183, 1922.

0,1064 g Substanz: 0,0658 g Ag.

$C_4H_4O_5Ag_2$. Ber. Ag = 62,03 Proz.; gef. Ag = 61,84 Proz.

Die Säure hatte bei der Behandlung mit Uranylacetat eine Lösung von nachstehenden Drehungsverhältnissen ergeben. 0,05 g Substanz wurden in 14,0 ccm Wasser gelöst und mit 5,0 ccm gesättigter Uranylacetatlösung versetzt. Im 1-dcm-Rohr zeigte diese Mischung eine Ablenkung entsprechend — 1,2 Proz. Glucose. Genau dieselbe Drehung hat *K. Ohta* (l. c.) angegeben. Der Uranylacetat-methode hat sich *Dakin* (l. c.) ebenfalls bedient; er hat aber neuerdings[1]) gefunden, daß auch bei der Vergärung von Zucker im Gärgut geringe Mengen Äpfelsäure auftreten und mit Uranylacetat nachgewiesen werden können. Diese kleinen Quantitäten von Äpfelsäure entstammen der biochemischen Umwandlung von Hefeprotein, und zwar der Oxyglutaminsäure. Genau wie die einfache Glutaminsäure nach den Untersuchungen von *F. Ehrlich*[2]) Bernsteinsäure liefert, ergibt die Oxyglutaminsäure Oxybernsteinsäure, das ist Äpfelsäure. Da nun zur Desaminierung der Aminosäuren der *gleichzeitige Ablauf einer alkoholischen Zuckerspaltung* als energieliefernder Prozeß erforderlich ist, so war es von vornherein nicht zweifelhaft, daß die verhältnismäßig große, von uns beobachtete Äpfelsäuremenge nicht aus der stickstoffhaltigen Substanz der Hefe herrühren, sondern aus der Oxalessigsäure hervorgegangen sein mußte. Zur Sicherung des Ergebnisses haben wir jedoch einen Kontrollversuch vorgenommen, bei dem 66 g Rohrzucker in 5 Liter Wasser mit 660 g Unterhefe vergoren wurden. Dieser Ansatz war gleichzeitig mit dem Oxalessigsäureversuch und unter denselben Bedingungen angestellt. Die über Bleiverbindungen gereinigte Endlösung ergab in unserem Falle überhaupt keine mit Uranylacetat optische Aktivität zeigende Substanz.

Zur weiteren Sicherung des Ergebnisses führen wir an, daß mit einer Lösung von 0,05 g unserer aus Oxalessigsäure gewonnenen Äpfelsäure in 19 ccm reinem Wasser keinerlei Ablenkung im Polarimeter wahrzunehmen war, daß vielmehr das Drehungsvermögen erst in der für Äpfelsäure charakteristischen Weise nach Zugabe von essigsaurem Uranyl bemerkbar wurde.

III. Nachweis von β, γ-Butylenglykol.

Zur Isolierung dieses zweiwertigen Alkohols der Butylenreihe verfuhren wir nach den Angaben, die *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*[3]) für die Abscheidung des Glycerins bei Verwirklichung der zweiten Vergärungsform gemacht haben. Das filtrierte Gärgut wurde im *Faust*-

[1]) *H. D. Dakin*, Journ. of biol. Chem. **61**, 139, 1924.
[2]) *F. Ehrlich*, diese Zeitschr. **18**, 391, 1909.
[3]) *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, diese Zeitschr. **92**, 234, 1918.

*Heim*schen Verdunstungskasten bei etwa 30° zu Sirup eingeengt. Durch sorgfältiges Verreiben mit absolutem Alkohol, wobei der Rückstand eine pulverartige Beschaffenheit annehmen muß, wurde das Butandiol extrahiert. Seine alkoholische Lösung wurde alsdann bei einer Badtemperatur nicht über 35° in vacuo abermals zu Sirup konzentriert. Der hinterbliebene Rückstand wurde mit absolutem Alkohol aufgenommen, wobei Verunreinigungen sich flockig ausschieden. Nach Entfernung derselben durch Filtration wurde die Alkohollösung wiederum in vacuo verdampft und erneut mit absolutem Alkohol aufgenommen, wobei eine klare Lösung entstand, aus der durch Zufügung des gleichen Volumens absoluten Äthers kleine Mengen einer krümeligen Substanz ausgeschieden wurden. Von diesen wurde abfiltriert, der Alkohol und Äther wurden verdunstet. Der jetzt hinterbliebene Rückstand löste sich nicht nur klar in absolutem Alkohol, sondern zeigte auch auf Zugabe des gleichen Volumens Äther keine Trübung mehr. Die alkoholisch-ätherische Lösung wurde deshalb über frisch geglühtem Glaubersalz getrocknet und am Birektifikator abdestilliert. Die hinterbliebene dickliche Flüssigkeitsmenge wurde mit wasserfreiem Alkohol in ein Fraktionierkölbchen übergespült und im Vakuum bei 13 mm destilliert. Nach dem hauptsächlich Weingeist enthaltenden Vorlauf wurden 3,5 g einer zwischen 91 und 95° siedenden Fraktion erhalten und besonders aufgefangen. Alsdann stieg das Thermometer schnell, und aus dem Kolbenrückstand entwickelten sich Dämpfe als Zeichen beginnender Zersetzung, wobei eine braunschwarze Masse zurückblieb. Die Fraktion von 91 bis 95° wurde der Destillation unter Atmosphärendruck unterworfen und lieferte eine Fraktion im Gewicht von 1,9 g, die den richtigen Siedepunkt des 2, 3-Butylenglykols (184°) aufwies.

Die Analyse bestätigte, daß es sich um Butandiol handelt.

0,1044 g Substanz: 0,2029 g CO_2 und 0,1090 g H_2O.
$C_4H_{10}O_2$. Ber. C = 53,30 Proz.; H = 11,19 Proz.;
gef. C = 53,02 „ ; H = 11,68 „ .

Das Vorliegen von Butylenglykol ergab sich auch aus dem Verhalten der Substanz. Ihre wässerige Lösung reduzierte *Fehling*sche Mischung nicht im geringsten, wohl aber löste sie Kupferhydroxyd nach Zugabe von Natronlauge auf. Sie reagierte neutral und erlangte durch Behandlung mit Wasserstoffsuperoxyd und Eisensalz oder Soda und Brom[1]) ein starkes, schon in der Kälte sich geltend machendes Reduktionsvermögen gegenüber alkalischer Kupfermischung, das auf Oxydation zum Acetoin zu beziehen ist.

---

[1]) *E. Fischer* und *J. Tafel*, Ber. **20**, 3385, 1887; *G. S. Wapole*, Chem. Centralbl. **1911**, I, 1309.

Autorenverzeichnis.